

CLÁUDIA TURRA PIMPÃO

**AVALIAÇÃO AGUDA DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA
DELTAMETRINA EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE FLUVIAL
NATIVO: ESTUDO BIOQUÍMICO E IMUNOTÓXICO**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Processos
Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da
Universidade Federal do Paraná. Área de
Concentração: Saúde Animal**

**Orientadora: Profa. Dr^a. Helena Cristina
da Silva de Assis**

CURITIBA

2006

CLÁUDIA TURRA PIMPÃO

**AVALIAÇÃO AGUDA DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA
DELTAMETRINA EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE FLUVIAL
NATIVO: ESTUDO BIOQUÍMICO E IMUNOTÓXICO**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora abaixo assinada:

Dra. Helena Cristina da Silva de Assis (orientadora)

Universidade Federal do Paraná

Dr. Ciro Ribeiro de Oliveira

Universidade Federal do Paraná

Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski

Universidade Federal do Paraná

Dr. Marcelo Muscará

Universidade Federal de São Paulo

Dra. Daniele Cabrini

Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 23 de novembro de 2006

"Ser professor é importar-se com o outro, numa dimensão de quem cultiva uma planta muito rara que necessita de atenção, amor e cuidado... é ter a capacidade de sair de cena, sem sair do espetáculo."

Santuza Abras

DEDICATÓRIA

Esta tese é uma homenagem a todos de bem e que possuem ética, quem sabe o valor do estudo e do trabalho honesto.

Dedico este trabalho, com gratidão e amor, ao Paulo, meu “companheiro de vida”, pela imensurável felicidade e satisfação que me proporciona simplesmente em ser como é. Por ter enfrentado todos os momentos difíceis e também os momentos de alegria durante estes anos de estudo. Na verdade um presente que Deus, em Sua imensa bondade, colocou na minha vida. “Seja sempre o meu melhor presente”. Serei eternamente agradecida por ter ajudado-me a gostar da mulher que me tornei.

AGRADECIMENTOS

Uma tese não é fruto do trabalho solitário, pelo contrário, é resultado da dedicação de várias pessoas. Por isto, aqui estão alguns agradecimentos àqueles que deram sua contribuição, maior ou menor, para que este objetivo fosse atingido.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, pela orientação, pelo apoio, pelo estímulo, pela dedicação, pelo incentivo constante às minhas atividades e pela paciência e amizade no tratamento para comigo, qualidades que com certeza alimentaram minha perseverança.

Ao Prof. Dr. Aleksander Zamprônio por sua disposição e atenção com que sempre me recebeu para troca de idéias e ensinamentos.

A Profa. Dra. Vanete Soccol, pela indicação e apresentação a minha orientadora.

Ao meu estimado amigo e irmão Rodrigo Mira, que sempre me incentivou e sempre esteve disposto a escutar reclamações e lamentações, mostrando com toda sua paciência e compreensão o melhor caminho a ser seguido, dando conselhos pertinentes com a melhor das diplomacias. Com certeza, sem sua ajuda não teria conseguido chegar ao final deste trabalho.

A minha querida amiga e irmã Kung, sempre ajudando, conversando e tentando resolver todos os problemas que apareciam. Seu apoio foi importantíssimo para obter este resultado.

Aos meus ex-alunos Rolf Modesto, César Lima e Adriane Bonilha pela ajuda na captura dos peixes, enfrentado escuridão e frio nas coletas.

A minha ex-monitória Carine Budziak pela ajuda na digitação e preparação de alguns reagentes.

À Professora Rita Maria Venancio Mangrich Rocha pela ajuda na execução e interpretação na parte de Hematologia deste estudo. Agradecimento este extensivo aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário Cynthia Cristina Venancio da Silva e Sérgio Benício de Almeida.

Aos Funcionários do departamento de Farmacologia da UFPR.

Aos meus colegas de batalha do laboratório de inflamação do departamento de Farmacologia da UFPR, em especial a Márcia e o Eduardo, pois lutamos juntos para realizar os experimentos da melhor forma possível.

Ao Professor Sylvio Péllico Netto, Decano do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da PUCPR pela confiança que deposita em meu trabalho como professora.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná pelos recursos fornecidos em materiais para auxílio da experimentação.

As secretárias Caroline, Luciana e Josiane, pelos auxílios prestados.

À Coordenação do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná

Ao eterno Professor Metry Bacila, que considero ser uma pessoa importantíssima em minha ascensão profissional.

Em especial também a minha família por estarem sempre por perto em todas as horas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que este trabalho se concretizasse e que, por minhas limitações humanas, acabei não mencionando.

A Deus, Energia infinitamente superior ao ser humano, por ter conseguido, mesmo apesar de todas as dificuldades, chegar ao final de mais uma etapa da minha vida.

Em especial também gostaria de agradecer á todos os meus alunos e ex-alunos por colaborarem, apoiarem, ajudarem, pedirem, perguntarem, responderem, rirem e sorrirem, sempre que necessário, mostrando que tudo vale a pena, pois ao entrar em sala de aula e olhar os rostos curiosos é fácil esquecer as coisas que naquele momento estão fora de contexto e tentar passar um pouco de experiência vivida.

E por último e não menos importante, porém não sei direito como fazer, mas agradecer meu fiel cão amigo “GUGA”, pois com seus gestos e ações mostra-me a simplicidade da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 PIRETRÓIDES.....	2
1.1.1 DELTAMETRINA.....	4
1.2 BIOMARCADORES.....	5
1.2.1 ATIVIDADE COLINESTERÁSICA.....	10
1.2.2 ATIVIDADE DA ETOXIRESORUFINA- <i>O</i> -DEETILASE.....	11
1.2.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA <i>S</i> -TRANSFERASE.....	13
1.3 HEMATOPOIESE.....	15
1.3.1 HEMATOLOGIA.....	17
1.3.2 MIGRAÇÃO CELULAR.....	25
1.3.3 CULTIVO CELULAR.....	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 ESPÉCIE UTILIZADA.....	33
3.2 ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES.....	33
3.3 DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES.....	34
3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	34
3.4.1 1º ETAPA – EFEITO AGUDO DA DELTAMETRINA NOS PARÂMETROS ENZIMÁTICOS EM <i>A. multispinis</i>	34
3.4.1.1 COLINESTERASE (ChE).....	35
3.4.1.2 ETOXIRESORUFINA- <i>O</i> -DEETILASE (EROD).....	36
3.4.1.3 GLUTATIONA- <i>S</i> -TRANSFERASE(GST).....	37
3.4.1.4 ANÁLISE PROTEÍCA.....	37
3.4.2 2º ETAPA – PADRONIZAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR E EFEITOS DA DELTAMETRINA NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DO EXSUDATO PERITONEAL <i>A. multispinis</i>	37
3.4.2.1 PARAMÊTROS HEMATOLÓGICOS.....	38
3.4.2.2 PARAMÊTROS DO EXSUDATO PERITONEAL.....	38
3.4.2.3 EFEITO DOSE E TEMPO / RESPOSTA.....	39
3.4.2.4 EFEITOS DA DELTAMETRINA NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E NO EXSUDATO PERITONEAL SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO POR LPS.....	39
3.4.3 3º ETAPA – CULTIVO CELULAR <i>A. multispinis</i>	40
3.4.3.1 ESTERILIZAÇÃO.....	40

3.4.3.2 PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE MONOCAMADAS DE MACRÓFAGOS.....	40
3.4.3.3 ESTIMULAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DOS MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE LPS.....	41
3.4.3.4 ESTIMULAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DOS MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE DEXAMETASONA.....	41
3.4.3.5 ESTIMULAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DOS MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE DELTAMETRINA.....	42
3.4.3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	43
3.4.3.7 VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO DE EXCLUSÃO DE CORANTE.....	43
3.4.3.8 VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO DO MTT.....	44
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	45
4.1.1 COLINESTERASE.....	45
4.1.2 ETOXIRESORUFINA- <i>O</i> -DEETILASE.....	46
4.1.3 GLUTATIONA <i>S</i> -TRANSFERASE.....	47
4.2 MIGRAÇÃO CELULAR EM <i>A. multispinis</i>	47
4.2.1 DOSE E TEMPO RESPOSTA DO LPS EM <i>A. multispinis</i> – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	47
4.2.2 DOSE E TEMPO RESPOSTA DO LPS EM <i>A. multispinis</i> – PARÂMETROS DO EXSUDATO PERITONEAL.....	49
4.2.3. VALORES HEMATOLÓGICOS BASAIS DE <i>A. multispinis</i>	50
4.2.4 EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE <i>A. multispinis</i> TRATADOS COM LPS.....	51
4.2.5 EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE OS PARÂMETROS DO EXSUDATO PERITONEAL DE <i>A. multispinis</i> TRATADOS COM LPS.....	57
4.3 CULTIVO CELULAR EM <i>A. multispinis</i>	59
4.3.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE LPS PARA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM <i>A. multispinis</i>	59
4.3.2 EFEITO DA DEXAMETASONA E DO LPS SOBRE A PRODUÇÃO DE NO ₂ POR MACRÓFAGOS DO RIM DE <i>A. multispinis</i>	60
4.3.3 EFEITO DA DELTAMETRINA E DO LPS SOBRE O CULTIVO DE MACRÓFAGOS EM <i>A. multispinis</i>	61
4.3.4 VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS DE <i>A. multispinis</i>	62
5 DISCUSSÃO.....	64
5.1 AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA E HISTOPATOLÓGICA EM <i>A. multispinnis</i>	64
5.2 MIGRAÇÃO E CULTIVO CELULAR EM <i>A. multispinis</i>	66
6 CONCLUSÕES.....	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8 APÊNDICE.....	100

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	- EFEITO DA DELTAMETRINA (DM) SOBRE A ATIVIDADE COLINESTERÁSICA DE <i>A. multispinis</i>	45
FIGURA 02	- EFEITO DA DELTAMETRINA (DM) SOBRE A ATIVIDADE DA EROD DE <i>A. multispinis</i>	46
FIGURA 03	- EFEITO DA DELTAMETRINA (DM) SOBRE A ATIVIDADE DA GST DE <i>A. multispinis</i>	47
FIGURA 04	- CURVA DOSE RESPOSTA DE LPS SOBRE O NÚMERO DE LEUCÓCITOS DO SANGUE DE <i>A. multispinis</i>	48
FIGURA 05	- INFLUÊNCIA DO TEMPO SOBRE O NÚMERO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE INDUZIDOS POR LPS EM <i>A. multispinis</i>	48
FIGURA 06	- CURVA DOSE RESPOSTA DE LPS SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NA CAVIDADE PERITONEAL DE <i>A. multispinis</i>	49
FIGURA 07	- INFLUÊNCIA DO TEMPO SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NA CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDO POR LPS <i>A. multispinis</i>	50
FIGURA 08	- EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O NÚMERO DE LEUCÓCITOS/ μ L SANGUÍNEOS EM <i>A. multispinis</i> TRATADOS OU NÃO POR LPS.....	52
FIGURA 09	- EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O NÚMERO DE ERITRÓCITOS / μ L SANGUÍNEOS EM <i>A. multispinis</i> TRATADOS OU NÃO POR LPS.....	53
FIGURA 10	- EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE A TAXA DE HEMOGLOBINA EM <i>A. multispinis</i> TRATADOS OU NÃO POR LPS.....	54
FIGURA 11	- EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE OS VALORES DA TAXA DE HEMATÓCRITO EM <i>A. multispinis</i> TRATADOS OU NÃO POR LPS.....	56
FIGURA 12	- EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE O NÚMERO DE LEUCÓCITOS / μ L DE LÍQUIDO PERITONEAL EM <i>A. multispinis</i> TRATADOS OU NÃO POR LPS.....	58
FIGURA 13	- EFEITO DO LPS SOBRE A LIBERAÇÃO DE NITRITO POR MACRÓFAGOS.....	59
FIGURA 14	- EFEITO DA DEXAMETASONA (DEXA) SOBRE A LIBERAÇÃO DE NITRITO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM LPS.....	60
FIGURA 15	- EFEITO DA DELTAMETRINA (DM) SOBRE A LIBERAÇÃO DE NITRITO POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM LPS.....	61
FIGURA 16	- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS DE RIM DE <i>A. multispinis</i> TRATADOS COM DEXAMETASONA (0,3 E 0,9 μ g.mL ⁻¹ – PAINEL A) E DELTAMETRINA (0,3 E 1 μ g.mL ⁻¹ - PAINEL B) DURANTE 48 HORAS.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	- VALORES MÉDIOS E ERROS PADRÃO DE ERITRÓCITOS, LEUCÓCITOS, HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO EM <i>A. multispinis</i> (CASCUDO) (n=32).....	51
TABELA 02	- VALORES MÉDIOS E ERROS PADRÃO DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS/ μ L DE SANGUE DE <i>A. multispinis</i> EXPOSTOS OU NÃO A DELTAMETRINA (0,1 e 0,3 mg.kg ⁻¹) E ESTIMULADOS OU NÃO COM LPS (100 μ g.kg ⁻¹). (n=10).....	52
TABELA 03	- VALORES MÉDIOS E ERROS PADRÃO DO NÚMERO DE ERITRÓCITOS/ μ L DE SANGUE DE <i>A. multispinis</i> OU NÃO A DELTAMETRINA (0,1 e 0,3 mg.kg ⁻¹) E ESTIMULADOS OU NÃO COM LPS (100 μ g.kg ⁻¹). (n=10).....	54
TABELA 04	- VALORES MÉDIOS E ERROS PADRÃO DA TAXA DE HEMOGLOBINA (g/dL) DO SANGUE DE <i>A. multispinis</i> EXPOSTOS OU NÃO A DELTAMETRINA (0,1 e 0,3 mg.kg ⁻¹) E ESTIMULADOS OU NÃO COM LPS (100 μ g.kg ⁻¹). (n=10).....	55
TABELA 05	- VALORES MÉDIOS E ERROS PADRÃO DA TAXA DE HEMATÓCRITO (%) DO SANGUE DE <i>A. multispinis</i> OU NÃO A DELTAMETRINA (0,1 e 0,3 mg.kg ⁻¹) E ESTIMULADOS OU NÃO COM LPS (100 μ g.kg ⁻¹). (n=10).....	56
TABELA 06	- VALORES MÉDIOS E ERROS PADRÃO DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS/ μ L DE LÍQUIDO PERITONEAL DE <i>A. multispinis</i> ESTIMULADOS COM OU NÃO COM LPS (100 μ g.kg ⁻¹) E EXPOSTOS OU NÃO A DELTAMETRINA (0,1 e 0,3 mg.kg ⁻¹). (n=10).....	58
TABELA 07	- VIABILIDADE CELULAR DA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE <i>A. multispinis</i> POR DELTAMETRINA E LPS.....	62

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - por cento
 ϵ – coeficiente de extinção molar
 $^{\circ}\text{C}$ – graus celsius
3MC – 3 metilcolantreno
7 ER – 7-etoxiresorufina
ACh – acetilcolina
ATP – adenosina trifosfato
BNF - β -naphthoflavona
cm - centímetros
ChE – colinesterase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média
CYP1A – citocromo P 1A
DEXA - dexametasona
dL - decilitro
DM - deltametrina
DTNB – 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
ep – erro padrão
EROD – etoxiresorufina-*O*-deetilase
FMO – monooxigenases flavoproteínas
g - grama
GABA – ácido gama amino butírico
GSH – glutathiona reduzida
GST – glutathiona *S*-transferase
HE – hematoxilina/eosina
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
H₃PO₄ – ácido fosfórico
IP – via intraperitoneal
kg - quilograma
L - litro
LPS - lipopolissacarídeo
M - molar
MAF – ativador de macrófago
min – minuto
mM - miliMolar
MO – microscópio óptico
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nM - nanoMolar
nMol – nanomol
NaCl – cloreto de sódio
NaNO₃ – nitrato de sódio
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH - nicotinamida adenina fosfato dinucleotídeo reduzida
NO – óxido nítrico
μg - micrograma
μL – microlitro

μmol – micromol
μm - micrometros
OD – densidade óptica
O₂⁻ - ânion superóxido
OP - organofosforado
PBS – salina tamponada em fosfato
PCBs – bifenilas policloradas
PMN - polimorfonuclear
pH – potencial hidrogeniônico
PM – peso molecular
pmol – picomol
p/v – peso por volume
q.s.p – quantidade suficiente para
R² – coeficiente de correlação
RE – reticulo endoplasmático
SDS – dodecil sulfato de sódio
SNC – sistema Nervoso Central
UI – unidade internacional
v/v – volume por volume
VCM – volume corpuscular médio
VEIC – veículo ou controle
x g – força gravitacional

RESUMO

A deltametrina (DM), um piretróide sintético, é largamente utilizada em cultivos no Brasil, na medicina veterinária, no controle de pestes domésticas e na saúde pública, principalmente para controle de vetores. De modo geral os organismos não alvos, como as espécies aquáticas são extremamente sensíveis aos piretróides. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de doses subletais de deltametrina através da atividade enzimática da colinesterase (ChE), glutationa *S*-transferase (GST) e etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD), e da migração celular. Analisar também a produção de óxido nítrico (NO) através da estimulação de macrófagos “*in vitro*”, em uma espécie de peixe nativo *Ancistrus multispinis*. Foram utilizados três grupos (controle, DM0,1 e DM0,3 mg.kg⁻¹) para as análises enzimáticas e outros seis grupos com 10 peixes cada (controle, lipopolissacarídeo - LPS, LPS+DM0,1, LPS+DM0,3, DM0,1 e DM0,3 mg.kg⁻¹, via IP) para a migração celular. As colheitas de sangue, exsudato peritoneal e tecidos (músculo, brânquias e fígado) foram realizadas 96 horas após a exposição ao piretróide. Procedeu-se à contagem total de leucócitos e de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito sangüíneo, contagem total de leucócitos do exsudato peritoneal e análises enzimáticas. O cultivo celular foi realizado extraíndo os macrófagos dos rins dos peixes, as células foram ajustadas a 2x10⁶ cel.mL⁻¹, incubado por 24 horas (23°C). Após este período foram realizados 6 tratamentos (meio, LPS 10µg.mL⁻¹, LPS+DM0,3, LPS+ DM1, DM0,3 e DM1 µg.mL⁻¹) por 48 horas, sendo realizado a dosagem de óxido nítrico. Os dados foram analisados por ANOVA seguidos por teste de Bonferroni. Houve aumento significativo da atividade colisterásica, redução significativa da GST e não houve alteração da EROD nos grupos com DM. Os resultados obtidos mostraram aumento significativo de todos os grupos tratados para os valores dos leucócitos e eritrócitos no sangue quando comparados com o grupo controle. Os valores da taxa de hemoglobina foram maiores nos grupos com DM na maior dose. Não houve alterações nos valores do hematócrito. Na cavidade peritoneal do *A. multispinis* existe naturalmente uma pequena população de leucócitos, porém após a inoculação de LPS a migração de leucócitos aumentou significativamente. No cultivo celular houve aumento significativo na quantidade de nitrito de todos os grupos tratados em relação ao controle. O grupo LPS + DM1µg.mL⁻¹ também apresentou um aumento em relação aos outros grupos tratados. Podemos concluir que a DM causou uma leucocitose em *A. multispinis* e que essa espécie é um bom modelo para avaliar efeitos tóxicos de piretróides e para estudos de migração celular. O método *in vitro* pode ser utilizado para avaliar efeitos potenciais de agentes tóxicos do sistema imune de peixe e, a DM mostrou ser um ativador de NO através dos macrófagos de *A. multispinis* tal qual o LPS.

ABSTRACT

Deltamethrin (DM), a synthetic pyrethroid, is widely applied in Brazilian crops, in the veterinary medicine, in the pest control and in public health against vectors. However, non-target species such as the aquatic organisms, mainly fish, DM is sensitive to pyrethroids. The aim of this study was to evaluate the effect of sublethal doses of DM through enzymatic activity of cholinesterase (ChE), glutathione *S*-transferase (GST) and ethoxiresorufin-*O*-deethylase (EROD), and cellular migration. The nitric oxide (NO) was analysed through macrophage stimulation “*in vitro*” from *A. multispinis*, a native fish. Three groups of animals were used (control, DM 0.1 and DM 0.3 mg.kg⁻¹) for enzymatic analysis, and six other groups were used (control, Lypopolissacharideo-LPS, LPS+DM 0.1, LPS+DM 0.3, DM 0.1 and DM 0.3 mg.kg⁻¹, IP), each one with 10 fish for cellular migration. The blood and tissues (muscle, gills and liver) were collected 96 hours after the pyrethroid exposure. Total leukocytes and erythrocytes count, hemoglobin rate and hematocrit, leukocytes of peritoneal exsudate, enzymatic and histopathological analysis were carried out. Macrophages were collected from the fish kidney, the cells 2x10⁶ cells.mL⁻¹, incubated for 24 h at 23°C for adherence. Six treatments were carried out (medium, LPS 10µg.mL⁻¹, LPS+DM 0, 3, LPS+ DM 1, DM 0, 3 and DM 1 µg.mL⁻¹) for 48 h and the NO dosage analysed. The data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's test. It was observed a significant increasing of the ChE activity and significant reduction of GST and no significant alteration of EROD in the DM groups. The blood leukocytes and erythrocytes of all the groups were significantly different to the control group. The hemoglobin levels increased in the highest dose. There was not alteration in the values of the hematocrit. There was naturally in the cavity peritoneal a small leukocytes population, however after inoculation of LPS the leukocytes migration increased significantly in relation to control animals. The NO production increased in all the treated groups in relation to control group. The group DM 1µg.mL⁻¹ induced a significant increase in relation to other groups too. The DM caused a leucocytose in *A. multispinis* and this specie is a good model to evaluate toxic effects of pyrethroid and to the cellular migration studies. The “*in vitro*” method can be used to evaluate potential effects of toxic agents of fish immune system. DM could be an activator of NO production of *A. multispinis* as LPS.

1) INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e tecnológico tem como consequência a liberação de dejetos industriais nas águas e a emissão de partículas poluentes na atmosfera de diversos países, em todos os continentes. A redução da qualidade da água é evidente por causa dos dejetos. Considerando o crescimento da população, das indústrias, da ciência e da tecnologia houve necessidade de uma demanda maior de produtos agrícolas, tais como, inseticidas, para acompanhar e controlar principalmente o aumento da produção vegetal. Em decorrência disto, ocorreram danos aos diferentes ecossistemas devido ao desconhecimento da persistência e ação destes agentes no ambiente, ou mesmo, pela falta de planejamento de utilização dos mesmos.

Segundo WILSON & TISDELL (2001) o consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas e deste total, 85% são utilizados na agricultura. No âmbito da América latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxicos, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região. De um modo geral, o consumo destes pesticidas no meio rural decresce na seguinte ordem: herbicidas > inseticidas > fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas. Estes englobam compostos quimicamente bastante diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organofosforados, os piretróides, os organoclorados e os carbamatos (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

Entretanto, o crescimento do uso de pesticidas vem causando sérios danos para o meio ambiente. Parte deste material incorpora-se às plantas e ao solo e grande parte é transportada para os rios pelas chuvas. Os efeitos do uso de pesticidas constituem um problema reconhecido mundialmente e agravado pela utilização inadequada dos mesmos (TSUDA et al., 1995; WILSON & TISDELL, 2001). O uso de pesticidas na agricultura pode causar problemas de intoxicação em trabalhadores rurais que manipulam e aplicam estes produtos de alta toxicidade. O risco do uso excessivo de agrotóxicos afeta, além de agricultores, os consumidores dos produtos agrícolas, animais domésticos, os alimentos, como frutos e vegetais, as fontes hídricas e o ecossistema como um todo (SANTOS, 1996; WILSON & TISDELL, 2001).

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos por inseticidas tem crescido no meio científico. Estudos desenvolvidos em várias regiões do mundo,

mostram que a porcentagem dos produtos utilizados na agricultura que atingem os ambientes aquáticos é geralmente baixa, entretanto, pesticidas persistentes e com grande mobilidade no ambiente tem sido detectados nas águas superficiais e subterrâneas. A concentração da maioria dos inseticidas é baixa em parte, devido ao fato de serem menos solúvel em água e em parte devido ao efeito de diluição. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações elevadas venham a ocorrer, principalmente, após as pesadas chuvas. No entanto, mesmo em concentrações baixas, os inseticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos (DORES & FREIRE, 2001).

A intoxicação por pesticidas em peixes pode ocorrer de forma aguda ou crônica. Em geral, na intoxicação aguda ocorre mortalidade em massa dos peixes. No entanto, a poluição é um processo muitas vezes crônico, aparentemente sem danos visíveis, podendo causar vários efeitos subletais (RODRIGUES, 2003). Segundo SARAVANA BHAVAN & GERALDINE (2000) a exposição de organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito baixas de pesticidas, resulta em alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em tecidos vitais.

Vários estudos estão sendo realizados em torno dos efeitos moduladores de agentes tóxicos sobre os organismos aquáticos. Dentre estes, alguns inseticidas como organofosforados, piretróides e carbamatos, que podem agir sobre o sistema imunológico dos peixes. Porém, o exato mecanismo de ação destes tipos de substâncias sobre o sistema de defesa ainda não está elucidado. No entanto, alguns autores corroboram ao fato de que as contaminações por este tipo de substâncias afetam tanto os mecanismos fisiológicos quanto os imunológicos (IWANA & NAKANISHI, 1996).

1.1) PIRETRÓIDES

Os piretróides são inseticidas de origem vegetal, obtidos a partir da trituração das flores de algumas plantas pertencentes ao gênero *Chrysanthemum*. O piretro é um inseticida instável na luz e no ar, o que limita a sua efetividade na proteção de lavouras e no controle de insetos. O desenvolvimento de piretróides sintéticos é resultado de tentativas de modificar a estrutura das piretrinas naturais, no sentido de diminuir a fotossensibilidade, reter a potente e rápida atividade de inseticida e a

toxicidade aguda relativamente baixa do piretro para mamíferos (SODERLUND et al., 2001).

Estes compostos (piretróides) apresentam amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em baixa dose, baixo poder residual e, adicionalmente, são praticamente atóxicos para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas. Apesar da baixa toxicidade verificada para mamíferos, estudos toxicológicos recentes com 243 pesticidas mostraram que os piretróides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes e crustáceos (WHO, 1990). Assim, o uso indiscriminado de piretróides pode afetar drasticamente o equilíbrio já precário no meio ambiente, requerendo seu monitoramento pelas análises de seus resíduos e de seus efeitos (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

O desenvolvimento de piretróides sintéticos envolveu processos interativos de modificação estrutural e avaliação biológica para que estes fossem comercializados. A maior parte dos piretróides sintéticos foram desenvolvidos pela substituição de elementos estruturais das piretrinas, os quais conservam parte da molécula original, a forma molecular e propriedades físicas da estrutura modelo. A inclusão do substituinte α -ciano (surtingo à classificação de piretróide tipo II, neste caso, e tipo I, sem o grupo α -ciano) na metade álcool 3-fenoxibenzil, como na deltametrina, produziu compostos com maior potência que a permetrina, mas apresentando ainda a mesma, instabilidade à luz (BALINT et al., 1995).

Os piretróides sintéticos são metabolizados muito rapidamente no fígado de mamíferos. A reação inicial de desintoxicação em mamíferos é a clivagem da ligação éster, provavelmente por esterases, seguidas por reações de hidroxilação através do sistema citocromo P-450 e por várias reações de conjugação (HIEDER et al., 2001). A metabolização de um piretróide resulta no aumento significativo de sua solubilidade em água, facilitando assim sua rápida excreção na urina. Além do fígado, as principais reações metabólicas têm sido detectadas também nos nódulos linfáticos mesentéricos de ratos e camundongos (KALE et al., 1999).

Os principais efeitos observados na exposição por via oral dos mamíferos aos piretróides, aguda ou subcrônica, são efeitos neuroexcitatórios (CLARK, 1995). Piretróides do tipo I geralmente produzem tremores e os piretróides tipo II geralmente produzem convulsões e salivação (SODERLUND et al., 2001). Por serem considerados menos tóxicos para humanos que os inseticidas organoclorados e organofosforados, os piretróides têm múltiplas funções de uso na agricultura, na medicina veterinária, no

controle de pestes domésticas e na saúde pública, principalmente para controle de vetores (BARLOW et al., 2001). Entretanto, quando estes inseticidas são utilizados, por exemplo, na agricultura, organismos não-alvos como as espécies aquáticas podem ser expostas. Em peixes, os piretróides são altamente tóxicos, podendo causar efeitos tóxicos com uma dose cerca de mil vezes menor comparando-se com mamíferos (WHO, 1990).

GASSNER et al. (1997) verificaram que os piretróides permetrina e cihalotrina, em concentrações até 50 mmol.L⁻¹ são potentes inibidores do complexo I da cadeia respiratória, em mitocôndrias de fígado de rato. Por outro lado, a atividade ATPásica não foi afetada por estes piretróides. A aletrina, outro piretróide sintético, diminuiu a amplitude do edema de mitocôndrias de fígado de camundongo e estimulou o consumo de oxigênio mitocondrial (SETTLEMIRE et al., 1974). O fenvalerato diminui o consumo de oxigênio por peixes e de seus tecidos (músculo, fígado, e cérebro) (REDDY & PHILIP, 1992) e a cipermetrina (PHILIP et al., 1995) inibiu enzimas hepáticas de peixe.

1.1.1) DELTAMETRINA

A deltametrina foi originada em 1974, com a inclusão do grupamento substituinte α -ciano no grupo 3-fenoxibenzil, atribuindo-lhe maior potência inseticida que o composto sintetizado anteriormente (permetrina) e comercializada a partir de 1977 (SODERLUND et al., 2001).

A fórmula molecular da deltametrina é C₂₂H₁₉Br₂NO₃, quimicamente é um isômero (1R, *cis*; α S) de oito estereoisômeros ésteres do análogo dibromo do ácido crisantêmico, ou seja, (S)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-*cis*-3(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato. É preparada por esterificação do ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropanocarboxílico (Br₂CA) com álcool α -ciano-3-fenoxibenzil, ou por recristalização seletiva dos ésteres racêmicos obtidos da esterificação de (1R, 3R ou *cis*)-ácido com o racêmico ou álcool [α R, α S, ou α RS] (SODERLUND et al., 2001).

A deltametrina é um piretróide do tipo II, sendo estável na luz, umidade, ar, mas instável em meio alcalino. Pode-se considerar algumas características físicas e químicas da deltametrina: pó cristalino, sem cor e odor, densidade (20 °C) 0,5 g/cm³, massa molecular relativa igual a 505,24, ponto de fusão entre 98 – 101 °C, ponto de ebulição acima de 300 °C, solubilidade em água (20 °C) < 0,2 mg.mL⁻¹, solúvel em solventes orgânicos (WHO, 1990).

É muito utilizada em culturas vegetais como: arroz, batata, banana, cebola, maçã e soja, assim como no combate de ectoparasitas e insetos. Sendo que, foram encontrados resíduos em vários vegetais assim como no leite bovino, em dejetos de suínos e aves. Este pesticida pode causar danos ao meio ambiente e à saúde do trabalhador rural através do contato direto durante o manuseio e aplicação de tais produtos, ou de forma indireta na população em geral, através da ingestão de produtos alimentícios contendo resíduos dos pesticidas, muitas vezes acima dos limites toleráveis (WINSTON, 1991).

A exemplo de todos os piretróides sintéticos, a deltametrina também parece ser degradada por hidrólise da ligação éster central, e reações de conjugação para produzir metabólitos primários e secundários solúveis em água que serão excretados através do sistema urinário e biliar (CASIDA et al., 1983).

Tanto a porção ácida como a porção álcool da molécula de deltametrina foram quase completamente eliminadas do organismo de ratos machos entre dois a quatro dias após administração média, por via oral (0,64 -1,6 mg.kg⁻¹) (RUZO et al., 1978). Por outro lado, o grupo ciano foi eliminado mais lentamente, sendo detectado ainda oito dias após a administração de deltametrina. As principais reações metabólicas da deltametrina foram: a oxidação, que ocorre no grupo transmetil, relativo ao grupo carbonila da porção ácida, e nas posições 2'-, 4'-, e 5'-da porção álcool, a clivagem da ligação éster, e a conversão da porção ciano em tiocianato e ácido 2-iminotiazolidina-4-carboxílico (ITCA) (MCGREGOR, 2000). Os derivados fenólicos e o ácido carboxílico podem ser conjugados com grupos sulfato, glicina, e ácido glucurônico (MCGREGOR, 2000).

O mecanismo de ação inclui efeitos inibitórios nos receptores nicotínicos da acetilcolina (ACh), nos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), nas Ca²⁺/Mg²⁺-Adenosina Trifosfatases (ATPases) e nos canais de Ca²⁺ voltagem-dependente, porém a causa primária de toxicidade são seus efeitos excitatórios nos canais de Na⁺ voltagem-

dependente de insetos e vertebrados, resultando numa persistente ativação dos canais de Na^+ e despolarização da membrana (DEMOUTE, 1989).

O caráter lipofílico dos piretróides favorece um rápido acesso destes compostos aos tecidos, incluindo o sistema nervoso central. A administração intraperitoneal de 5-8 mg.kg^{-1} de deltametrina, resultou em concentrações de 0,12 -0,45 nmol.g^{-1} de tecido no cérebro de rato, causando o aparecimento dos primeiros sintomas neurotóxicos na exposição aguda (ALDRIDGE, 1990).

ANDRADE et al. (2002) investigaram os possíveis efeitos da exposição de ratas prenhes e em lactação a deltametrina. Os resultados mostraram que a exposição a baixas doses de deltametrina (1, 2, e 4 mg.kg^{-1}) induziu súbitas alterações no comportamento reprodutivo e na fisiologia dos filhotes machos, enquanto que as mães não foram afetadas.

Devido sua lipofilicidade, os piretróides têm alto grau de absorção nas brânquias, um fator que contribui na sensibilidade dos peixes à exposição aos piretróides aquosos (POLAT et al., 2002). Apesar de não serem persistentes no meio ambiente, sua toxicidade aguda em peixes é bastante alta. A deltametrina, foi responsável pela mortalidade de peixe *Anguilla anguilla* no Lago Balaton, na Hungria nos anos de 1991 e de 1995 (POLAT et al., 2002). Resíduos da substância foram encontrados no cérebro e fígado dos peixes. Alterações em enzimas hepáticas foram detectadas, bem como inibição significativa da acetilcolinesterase. Segundo BALINT et al., (1995) a dose letal (DL_{50}) 96 horas da deltametrina para peixes (carpas) está entre 0,4 e 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e a DL_{50} para ratos está entre 31 – 139 mg.kg^{-1} e 19 – 34 mg.kg^{-1} para camundongos.

REDDY & PHILIP (1994) utilizaram uma concentração subletal de cipermetrina em *Cyprinus carpio* machos e verificaram a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e ATPase. Estudos de MOORE & WARING (2000) avaliaram o efeito do piretróide cipermetrina na reprodução de salmão. Observaram que a exposição dos machos por cinco dias à concentração de 0,004 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cipermetrina via hídrica, reduziu a habilidade do sistema olfatório dos machos a detectar o ferormônio tipo $\text{PGF2}\alpha$ liberado pela fêmea na água, o que resultaria no aumento plasmático dos hormônios sexuais no macho. Além disso, diminuiu significativamente o número de ovos fertilizados. Além destes efeitos existem inúmeras evidências de que estas substâncias químicas podem gerar radicais livres de oxigênio e, conseqüentemente, danos patológicos aos seres vivos (WINSTON, 1991). Concentrações que causam

toxicidade em peixes ($0,77 \text{ nmol.L}^{-1}$ e $28,7 \text{ nmol.L}^{-1}$) foram descritas por MESTRES & MESTRES (1992) e GOLOW & GODZI (1994).

Efeitos neurofisiológicos, neuroquímicos e cardiovasculares são associados com a intoxicação em mamíferos. Aumento de alguns aminoácidos neurotransmissores (glutamato, serotonina e dopamina) e seus metabólitos durante a intoxicação foram detectados. Doses letais de deltametrina produziram aumento da pressão arterial em ratos adultos e aumento dos níveis de noradrenalina e adrenalina no plasma, assim como de glucose e lactato (BRADBURY & COATES, 1989).

Uma única dose de deltametrina ($0,75 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) em peixes da espécie *Channa punctatus* expostos por 48 horas, causou indução de várias enzimas antioxidantes no fígado, rim e brânquias. A peroxidação lipídica foi induzida em todos os órgãos, principalmente nas brânquias, e a glutatona e ácido ascórbico foram significativamente aumentados (SAYEED et al., 2003).

Segundo DAS & MUKHERJEE (2003) peixes expostos a doses subletais de cipermetrina podem ter parâmetros hematológicos e bioquímicos alterados. ADHIKARI et al. (2004) observaram redução significativa nos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito de *Labeo rohita* expostas a cipermetrina.

Vários estudos são relatados sobre toxicidade aguda de piretróides em peixes. SENER URAL & SAGLAM (2005) relatam que a deltametrina é altamente tóxica para peixes, sendo que os efeitos adversos dependem da concentração e duração de exposição. GOLOW & GODZI (1994) concluíram que a deltametrina foi duas vezes mais tóxica que o dieldrin para tilápias. MESTRES & MESTRES (1992) relataram doses letais de deltametrina dissolvida em água por 96 horas de $0,39 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Oncorhynchus mykiss*, $1,84 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para *C. carpio* e $3,50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Sarotherodon mossambica*. SENER URAL & SAGLAM (2005) determinaram as doses letais para trutas expostas a deltametrina entre 1 h e 96 h de exposição sendo de 15, 87 a $0,69 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. WHO (1990) determinou a toxicidade aguda da deltametrina para *O. mykiss*, *Salmo salar* e *Salmo trutta* como 0,39-2,20, 0,59-1,97 e $4,7 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

1.2) BIOMARCADORES

O crescimento da população humana causou o desmatamento, a poluição doméstica, a industrial e a agrícola, que são ameaças crescentes para a ictiofauna, uma vez que em seu percurso na natureza estes poluentes chegam às águas dos rios e aos mares. Consequentemente, os animais aquáticos estão em constante contato com substâncias estranhas ao seu organismo. Estas substâncias foram denominadas xenobiontes e incluem dentre outros, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os flavonóides, os piretróides e as bifenilas policloradas.

Segundo GIESY & GRANEY (1989), existem vários níveis de organização que podem ser afetados pelos poluentes, sendo que, em cada um destes níveis, existem processos que podem ser empregados para monitorar ou prever os efeitos nos organismos, como os biomarcadores.

Segundo PEAKALL (1999), biomarcador pode ser definido como qualquer resposta biológica a químicos ambientais no indivíduo ou em parte dele, a qual demonstre uma alteração do estado normal do organismo. Se a taxa bioquímica/fisiológica medida não é significativamente diferente da normal, então o organismo não pode ser considerado como afetado, mesmo que o químico seja detectado no organismo, tecido ou fluido corporal.

Os biomarcadores integram sistemas biológicos operacionais indicando processos de contaminação ou intoxicação, em diferentes níveis de organização biológica. Ao representar um processo constitutivo do organismo, o biomarcador compreende uma resposta biológica que pode ser mensurada ou detectada por diversos métodos que compreendem a expressão de uma proteína ou alguma atividade catalítica, ou que se utiliza alguma estrutura do sistema biológico para se inferir alterações na organização do organismo, como por exemplo, uma alteração morfológica ao nível tecidual, celular ou até molecular. Os métodos no campo da bioquímica e da biologia molecular são, portanto, os mais utilizados para o estabelecimento e uso de uma resposta biomarcadora (OOST et al., 2003).

Segundo STEGEMAN et al. (1992), os biomarcadores permitem detectar uma contaminação ambiental, avaliar a magnitude da contaminação e identificar espécies ou populações em risco de contaminação. Para que um marcador seja utilizado de maneira eficaz ele deve possuir especificidade (deve demonstrar o efeito específico

de um determinado contaminante), seguir uma metodologia e logística acessível, além de possuir resultados que possibilitem diferenciação de possíveis oscilações fisiológicas.

Segundo OOST et al. (2003) os biomarcadores são subdivididos como: biomarcador de exposição (detecta e quantifica a presença do xenobionte, de seus metabólitos ou de sua interação com componentes moleculares ou celulares em compartimentos do organismo; infere exposição prévia e fornece os índices de bioacumulação da biota, estes determinados por métodos bioquímicos e de química analítica), biomarcador de efeito (parâmetros bioquímicos ou fisiológicos mensuráveis que correspondam a alterações em níveis molecular, celular ou tecidual que permitam inferir efeito adverso, prejudicial ao operar normal do organismo saudável, efeito pré-clínico, subletal ou até letal) e biomarcador de susceptibilidade (indica a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder à exposição a um xenobionte; elucida variações no grau de resposta diferencial entre organismos e demonstra a tolerância fisiológica adquirida ou controlada por expressão gênica hereditária).

O monitoramento da presença de xenobiontes em ambientes aquáticos pode, a partir de estudos com espécies residentes, beneficiar a qualidade do ambiente, juntamente com a saúde humana. A localização e a determinação da concentração dos poluentes podem assegurar a vida destas espécies, e também, um ambiente saudável garantindo ao homem sua utilização, quer para alimentação, quer para o abastecimento de água, quer para o lazer. Algumas agências ambientais, como a EPA (Environmental Protection Agency) e o ICES (International Council for Exploration of the Sea) recomendam a incorporação da análise de biomarcadores aos novos programas de monitoramento, como metodologias complementares, expressando o grau de toxicidade causado por xenobiontes aos organismos ambientais.

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens, pois são, normalmente, os primeiros a serem alterados, apresentam boa sensibilidade e relativa especificidade. Por detectarem alterações enzimáticas, os biomarcadores bioquímicos são considerados como sistemas de aviso precoce, indicando a contaminação do ambiente antes que ocorram danos mais severos aos organismos e, possivelmente, ao ecossistema (MCCARTHY & SHUGART, 1990). Dentre os marcadores bioquímicos utilizados, a atividade da colinesterase (ChE), glutathione *S*-transferase (GST) e a etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) merecem destaque, neste estudo.

1.2.1) ATIVIDADE COLINESTERÁSICA

A acetilcolinesterase possui dois locais ativos responsáveis pela degradação de acetilcolina: o esterásico e o aniônico. O aniônico possui um grupo carboxila do aminoácido aspartato ou glutamato, e tem como função atrair o nitrogênio quaternário positivo da acetilcolina. O esterásico é composto por três aminoácidos chamados de tríade catalítica: serina, histidina e glutamato. Este local exerce a função hidrolítica da enzima, através de forças eletrostáticas, dipolo-dipolo, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e de van der Waals. Desta forma o local aniônico funciona atraindo o substrato (acetilcolina) para ligar-se à enzima, e o local esterásico funciona transformando o substrato em produto. No final da reação, a acetilcolinesterase estará acetilada, mas desdobra-se rapidamente em enzima livre e ácido acético (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

As colinesterases são divididas em acetilcolinesterases que degradam ésteres do ácido acético, e em pseudocolinesterases, que hidrolisam também outros tipos de ésteres, como as butirilcolinesterases. A acetilcolinesterase é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina que permanece nas sinapses nervosas ou na junção neuromuscular após a transmissão do impulso nervoso. Sua inibição pode resultar em uma transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos. A butirilcolinesterase é encontrada, principalmente no plasma e fígado. Esta enzima possui, em média, 50% de homologia com a acetilcolinesterase, e considera-se de que a butirilcolinesterase atua como inibidor colinesterásico, preservando a atividade da acetilcolinesterase (JOHNSON & MOORE, 2003). Outras diferenças existentes entre a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase são: possuem inibidores específicos, diferentes níveis de sensibilidade ao substrato e parâmetros cinéticos próprios, além de terem diferentes locais de ação nos organismos (MASSOULIÉ et al., 1999).

A medida enzimática da acetilcolinesterase possibilita a detecção de efeitos toxicológicos subletais, mesmo sem a presença de sintomatologia clínica. WEISS (1958) demonstrou que peixes expostos a organofosforados (OP) apresentaram redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) proporcional à concentração e ao tempo de exposição. A inibição ainda foi dependente da natureza do OP e da espécie exposta. A remoção dos peixes a um local não contaminado levou a regeneração dos níveis de

acetilcolinesterase, sendo que o tempo de recuperação foi em função do grau de inibição e da natureza do composto. Este tipo de especificidade permite o uso de espécies de animais como bioindicadores da presença imediata ou recente destes compostos no ambiente aquático.

Apesar da inibição das colinesterases, ser considerada um biomarcador específico para animais expostos aos organofosforados ou carbamatos, esta especificidade tem sido questionada por alguns autores que observaram uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase em organismos aquáticos expostos a outros contaminantes, como metais pesados, hidrocarbonetos e efluentes de indústria de papel (LABROT et al., 1996; GUILHERMINO et al., 1998; GALGANI & BOCQUENE, 1990).

Sabe-se que os piretróides não são inibidores específicos da colinesterase, mas segundo REDDY & PHILLIP (1994), houve uma inibição da colinesterase em brânquias, músculos e fígados de carpas expostas a cipermetrina. SZEGLITES et al. (1995) relataram que a deltametrina inibiu a colinesterase plasmática de carpas em 20%. DAS & MUKHERJEE (2003) observaram redução significativa da AchE no cérebro de carpas expostas a cipermetrina. Em contrapartida, foi descrito aumento da colinesterase em músculo de trutas expostas a cipermetrina via hídrica (DAVIES & COOK, 1993).

1.2.2) ATIVIDADE DA ETOXIRESORUFINA-O-DEETILASE

O citocromo P450-dependente de monooxigenases (P450) é um biomarcador bastante estudado. O citocromo, uma heme proteína que contém ferro que, na sua forma reduzida, juntam-se com monóxido de carbono, produzindo um composto que absorve luz em 450nm (OMURA & SATO, 1964). Em peixes e em outros vertebrados, o citocromo P450-dependente de monooxigenases é principalmente encontrado no retículo endoplasmático (RE) e nas mitocôndrias de fígado, rim, cérebro e intestino delgado, assim como em outros órgãos. Eles compreendem uma família de enzimas da fase I, as quais oxidam, reduzem ou hidrolisam substâncias xenobióticas. A fase I de reações normalmente transforma xenobiontes lipofílicos em compostos mais solúveis em água, para então sofrerem desintoxicação e excreção. Entretanto, alguns

dos intermediários são altamente reativos e podem resultar em compostos altamente tóxicos e cancerígenos (BUCHELI & FENT, 1995).

Em reações dependentes das coenzimas NADH e NADPH, o citocromo P450 pode transformar ácidos graxos, esteróides, barbitúricos e outras drogas ou xenobiontes. A expressão do citocromo P450 é regulável pela presença de seus substratos, no fígado e outros tecidos, e grande parte dos poluentes orgânicos podem servir como indutores segundo MATHEWS e HOLDE (1990) e HEATH (1995). Desta forma o citocromo P450 tem importante participação nas reações de biotransformação de FASE I no fígado, responsáveis pelo metabolismo de xenobiontes lipossolúveis (MANAHAN, 2000).

As sub-famílias do citocromo P450 são classificadas considerando: o peso molecular monomérico, a composição de aminoácidos, a sequência terminal de aminoácidos, a especificidade ao substrato, a distinção por anticorpos específicos e o tipo de reação em que estão envolvidas. Em animais aquáticos, a sub-família CYP1A1 é expressa cataliticamente pela atividade da etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) que tem como substrato a 7-etoxiresorufina, participando de uma reação *O*-desalquilação (BUCHELI & FENT, 1995).

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade deste sistema de monooxigenases: a quantidade total de CYP1A, a atividade da EROD e a expressão do CYP1A (*Western blots*). Neste trabalho a atividade catalítica foi avaliada pela atividade da EROD. DAYAL et al. (1999) verificaram que a administração de deltametrina (5, 10 e 15 mg.kg⁻¹ por 7 dias ou 5 mg.kg⁻¹ por 15 e 21 dias) em ratos produziu um aumento significativo na atividade da EROD no fígado. Nenhuma alteração na atividade da EROD no fígado foi observada em turbot expostos a compostos nitroaromáticos (nitropirene e nitrofurantoína) injetados intraperitonealmente (MITCHELMORE et al., 1996). A indução da CYP1A medida através da atividade da EROD tem sido avaliada em várias espécies de peixes expostas a diversos tipos de contaminantes (PETERS et al., 1994; FENT & STEGEMAN, 1993; GOKSOYR & FORLIN, 1992; BINDER & STEGEMAN, 1980).

1.2.3) ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A glutathiona reduzida (GSH) é um composto tripeptídico (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que perfaz a maior parte dos grupos tiólicos livres da maioria das células vivas e, segundo MANAHAM (2000), participa: da desintoxicação de xenobiontes orgânicos (reações de conjugação: biotransformação de FASE II); da remoção de peróxidos pela glutathiona peroxidase; da proteção contra radiação ionizante e contra eletrófilos (cátions metálicos, por exemplo); da modulação de atividades enzimáticas dependentes do equilíbrio *redox* e da manutenção da condição reduzida dos grupos –SH de proteínas citosólicas.

A GSH atua, portanto como um tampão oxidativo, mantendo o citosol na condição reduzida, essencial para a célula. A oxidação da GSH produz o dissulfeto de glutathiona (GSSG), essa forma oxidada é produzida sob a ação enzimática da glutathiona peroxidase (GSHp) ou mesmo em reações não catalisadas. A glutathiona S-transferase (GST) representa uma família de enzimas homólogas envolvidas com as reações de Fase II no fígado: conjugação da GSH com o xenobionte ou com o metabólito produzido na Fase I, gerando compostos mais facilmente eliminados pela bile. Pela ação de tioltransferases como a GST, a GSH pode também originar compostos dissulfidrílicos. A glutathiona redutase (GSSGr) ligada a um sistema de carreadores de elétrons (NADPH/NADP⁺) mantém os níveis normais de GSH na célula. A GSHp, a GST, e a GSSGr atuam juntas para o equilíbrio *redox* do sistema GSH/GSSG (DAGGETT et al., 1998; MANAHAM, 2000; WRIGHT et al., 2000).

A conjugação de um metabólito com a glutathiona reduzida (GSH) é catalisada pela glutathiona S-transferase (GST) e consiste em ligar o xenobiótico com o GSH endógeno. Os conjugados de glutathiona podem ser excretados através da bile ou serem convertidos a ácido mercaptúrico no rim e serem eliminados através da urina (HABIG et al., 1974). As GST compõem uma família de enzimas desintoxicadoras que catalisam a conjugação do GSH com uma variedade de moléculas orgânicas endógenas e exógenas. As GST são predominantemente enzimas de fração citosólica (95%), e uma pequena porção (5%) pertence à fração microssomal (retículo endoplasmático) e mitocondrial. As GSTs estão largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, bactérias, moluscos, insetos, peixes, anfíbios e mamíferos (RODRIGUES, 2003). As GST também são responsáveis por ligar não-covalentemente

substâncias como bilirrubina, hormônios tireoidianos, hormônios esteróides, sais biliares e pesticidas. Esta característica tem como função, provavelmente, o armazenamento e o transporte destas substâncias dentro das células. As GST solúveis ou citosólicas foram agrupadas em 12 classes baseadas em seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, nas propriedades imunológicas e cinéticas e nas estruturas terciárias e quaternárias, sendo que as classes ϕ e τ são encontradas exclusivamente nas plantas, a classe δ é encontrada exclusivamente em insetos e a classe β é encontrada exclusivamente nas bactérias (RODRIGUES, 2003). As demais 8 classes estão presentes em vertebrados e são conhecidas como classes α , μ , π , θ , σ , κ , ζ e ω (RODRIGUES, 2003).

Como revisado por HEATH (1995), exposições crônicas de espécies de peixes marinhas ao cádmio, chumbo e mercúrio causam acréscimo nas concentrações hepáticas de GSH. Por outro lado o cádmio já foi observado causando o efeito contrário em *Anabas testudineus*, quando em exposição aguda a altas concentrações na água e isso foi acompanhado por um acréscimo na atividade da GST. Em trutas expostas ao zinco por via hídrica, houve acréscimo nos teores de GSH hepática (LANGE et al., 2002).

Muitos estudos que analisaram a GST em fígado de peixe expostos a diferentes tipos inseticidas mostraram uma indução enzimática (ANDERSSON et al., 1985; LEAVER et al., 1992; RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1991; SCOTT et al., 1992). Esta resposta normalmente é esperada uma vez que a GST faz um papel importante em desintoxicação e eliminação de xenobiontes. Porém, a inibição de atividade da GST também foi relatada em brânquias de mosquitofish expostos a carbofurano (RONDON-VON OSTEN et al., 2005). Peixes parecem ser deficientes no sistema enzimático na hidrólise de piretróides (BALINT et al., 1995).

PARVEZ & RAISUDDIN (2006) relataram aumento significativo da GSH em fígado, rins e brânquias de *Channa punctata* expostas a deltametrina. GOWLAN et al. (2002) relataram aumento significativo da GST em *Carcinus maenas* (caranguejo) expostos a cipermetrina em concentrações na água de 50 – 500 ng.L⁻¹ e na concentração de 10 ng.L⁻¹, injetada via intra-cefalotorácica.

1.3) HEMATOPOIESE

Os peixes são desprovidos de medula óssea e de linfonodos, assim os tecidos mielóides e linfóides estão, geralmente, associados no mesmo órgão, sendo o tecido linfóide de maior ou menor complexidade de acordo com a posição do peixe na escala filogenética.

Nos teleósteos, o rim cefálico além de tecido hematopoético possui função endócrina (ROCHA & FLORES, 2001) e imunológica promovendo a interação imuno-endócrina, de importância para ambos os sistemas, atuando na produção de anticorpos e de catecolaminas (WEYTS et al., 1999).

O rim cefálico e o baço são os principais órgãos hematopoiéticos de peixes teleósteos, uma vez que os centros hematopoiéticos desses órgãos são responsáveis pela origem e formação dos eritrócitos, linfócitos, monócitos, trombócitos e granulócitos. A origem e maturação dessas células são chamadas respectivamente: eritropoiese, linfopoiese, monopoiese, trombopoiese e granulopoiese. A magnitude da atividade hematopoiética do baço e rim cefálico difere entre as espécies de teleósteos. Nesses peixes pouco se conhece sobre as células fonte pluripotente (células que se dividem continuamente), sobre as células progenitoras e sobre as células precursoras (células geradas pela proliferação da célula fonte). Apesar das controvérsias, alguns autores sugerem que os hemoblastos linfóides são as células fontes responsáveis pela origem e formação das células linfóides e mielóides (TAVARES & MORAES, 2004).

A eritropoiese nos teleósteos é similar a de mamíferos, pois admite-se que os eritrócitos derivam de uma célula fonte. De acordo com o seu grau de maturação essas células são denominadas de eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromatofílicos, eritroblastos acidofílicos (ou ortocromatofílicos), reticulócitos (ou eritrócitos imaturos) e eritrócitos maduros. Entende-se por célula madura aquela que se diferenciou, tendo atingido a possibilidade de desempenhar suas funções específicas (TAVARES & MORAES, 2004).

Os eritrócitos em divisão, comumente observados na circulação, marcam o início do seu envelhecimento e a meia vida dos eritrócitos maduros varia entre as diferentes espécies de peixes. No período larval, cada linhagem de diferenciação hematopoiética ocorre no rim cefálico, sugerindo que esse órgão pode ser considerado homólogo à medula óssea dos mamíferos (PADRÓS & CRESPO, 1996).

A atividade hematopoiética varia entre as diferentes famílias de peixes. Em *O. mykiss* o rim cefálico é o principal responsável pela hematopoiese (FORERO, 1995). No *Carassius auratus* (Cyprinidae, Cypriformes) o rim é o principal sítio de formação de eritrócitos quando comparado com a reduzida atividade eritropoiética do baço (HOUSTON et al., 1996). Em *Oreochromis niloticus* e *Cirrhinus mrigala*, o baço também é órgão armazenador de reticulócitos e eritrócitos. Porém, em *Ictalurus punctatus* o baço é mais ativo na destruição de células sanguíneas que na hematopoiese, enquanto o rim é o principal órgão hematopoiético e mantém reservas de leucócitos maduros e trombócitos, os quais são liberados quando há demanda. Estudos em *C. auratus* sugerem que o rim cefálico é o principal órgão neutropoiético envolvido nos processos inflamatórios em teleósteos (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

A hematopoiese sofre influência de diversos fatores biológicos e ambientais. Em trutas, o baço e o rim cefálico apresentaram variação sazonal na distribuição de linfócitos, sendo elevado o percentual no outono e na primavera e reduzido nos meses de inverno e verão. Alterações no meio ambiente capazes de produzir estresse interferem na atividade hematopoiética, por exemplo, à água com pH alcalino reduz o número de eritrócitos e de neutrófilos maduros no rim e no baço, enquanto os hemoblastos linfóides e os reticulócitos aumentam com o grau de acidez e com o tempo de exposição (DHEER et al., 1987). O estresse e o aumento da temperatura ambiental provocam aumento da atividade eritropoiética do baço e do rim, enquanto a deficiência de nutrientes deprimem a eritropoiese, a leucopoiese e a trombopoiese (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Na literatura as opiniões são divergentes sobre a origem e desenvolvimento de células sanguíneas nos órgãos hematopoiéticos e algumas propostas são do século passado. Em princípio, DOWNEY (1909) estudando o tecido renal de *Polyodon spathula* (Polyodontidae, Acipenseriformes) observou pequenos e grandes linfócitos, assim como pequenos e grandes monócitos e concluiu que os linfócitos se desenvolveriam formando os pequenos monócitos. JORDAN & SPEIDLE (1924) propuseram a idéia de que o linfócito seria a célula fonte pluripotente para todos os tipos de células sanguíneas, denominada teoria monofilética. DUTHIE (1939) propôs que uma célula pluripotente denominada grande hemoblasto linfóide originaria os granulócitos por transformação direta. Após divisão mitótica formaria os pequenos hemoblastos linfóides, os quais originariam os eritrócitos, trombócitos e linfócitos.

Posteriormente, considerou que o grande hemoblasto linfóide, derivado da transformação de células reticulares, seria o precursor dos granulócitos enquanto os pequenos hemoblastos linfóides originados de células endoteliais seriam os precursores dos eritrócitos, linfócitos e trombócitos (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

1.3.1) HEMATOLOGIA

Os estudos hematológicos das diferentes espécies de peixes são de interesse ecológico e fisiológico, pois auxiliam na compreensão da relação entre as características sanguíneas, a filogenia, a atividade física, o hábitat e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente. Verifica-se que as diferentes espécies de peixes mesmo que do mesmo gênero, na maior parte dos casos, apresentam variações quanto aos valores da quantidade de eritrócitos, seu tamanho, volume, concentração de hemoglobina e hematócrito. Tais variações intra-específicas podem ser atribuídas às diferentes características de comportamento, hábitat, hábito alimentar, clima e outros fatores (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Em 1875, Gulliver propôs pela primeira vez o termo apirenemata para classificar os animais desprovidos de eritrócitos nucleados, como os mamíferos e, pirenemata para os animais com eritrócitos tipicamente nucleados, tais como os peixes, anfíbios, répteis e aves. O sangue dos peixes teleósteos é formado por eritrócitos, leucócitos e trombócitos (JAKOWSKA, 1959).

Ao penetrar na circulação sanguínea vindo dos órgãos hematopoiéticos, os reticulócitos contêm certa quantidade de ribossomos. Assim, quando corados apresentam cor azulada, devido à basofilia do RNA, que se sobrepõe à acidofilia do pigmento hemoglobina. Isso pode ser facilmente demonstrado com azul de brilhante cresil, o qual precipita o RNA, originando uma rede de material basofílico corado em azul (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas no sangue. A função dessas células consiste no transporte do oxigênio e do gás carbônico, desempenhado pelo seu componente principal, a hemoglobina. Esse padrão tem sido observado em grande variedade de peixes de diversos tipos de clima (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

O tamanho e o número de eritrócitos refletem a posição na escala evolutiva. Os maiores eritrócitos assim com seu menor número, são observados em vertebrados primitivos na escala zoológica. Possivelmente nos peixes primitivos, o sistema circulatório seja menos eficiente. Estudos recentes demonstraram que há relação inversa entre o tamanho dos eritrócitos e a habilidade natatória de teleósteos marinhos, com reflexo na concentração de hemoglobina. As espécies mais ativas apresentam maior número de eritrócitos, pois é alta a demanda de oxigênio e elevada a taxa metabólica. Entretanto, as espécies mais sedentárias possuem menor quantidade de eritrócitos, menor concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e maior volume de eritrócitos (VCM), porque possuem pouco músculo vermelho exaurindo-se rapidamente durante esforço físico (RAMBHASKAR & SRINIVASA-RAO, 1987).

TANDON & JOSHI (1976) estudando os eritrócitos de 33 espécies de teleósteos, concluíram que as espécies de menor porte geralmente possuem menor quantidade de eritrócitos que as maiores. No entanto, as espécies menores têm hábitos relativamente ativos, indo de local a outro e de alto a baixo, sendo sua demanda de oxigênio compatível com sua quantidade de eritrócitos.

O hematócrito também acompanha o aspecto evolutivo do peixe. Menores valores ocorrem em peixes mais primitivos na escala evolutiva, nos de ambiente lântico, nos sendetários e nos betônicos. Já os maiores valores ocorrem em espécies marinhas pelágicas (LARSSON et al., 1976) e ativas (RAMBHASKAR & SRINIVASA-RAO, 1987). Muitas vezes alterações no hematócrito podem ser resultantes de mudanças no volume dos eritrócitos.

A hemoglobina é composta por duas partes principais, a globina e a unidade heme, essa última é idêntica em todas as espécies de peixes até agora estudadas, mas a proteína globina difere de espécie para espécie em teleósteos. Sendo que o sistema de hemoglobina tem três categorias:

- Classe I (consiste em isomorfos de hemoglobinas cujas propriedades de oxigenação são afetadas pela temperatura, fazem parte desse grupo algumas espécies de linguados e carpas);
- Classe II (ocorre nas trutas e enguias e são funcionalmente heterogêneos, seu componente anodal é sensível à temperatura, enquanto a fração catodal é relativamente ou completamente insensível);

- Classe III (ocorre em poucas espécies, como nos atuns, os componentes isomorfos são comumente insensíveis à temperatura) (ALMEIDA – VAL & VAL, 1995).

A diversidade de hemoglobina em peixes pode ser consequência do fato desse pigmento respiratório estar na interface entre o organismo e o ambiente e, assim sofrer tanto a pressão fisiológica quanto ambiental (VAL, 1996). Parece também haver relação direta entre a concentração de hemoglobina e a atividade da espécie, as espécies pelágicas e migradoras apresentam maiores valores que as bentônicas (RAMBHASKAR & SRINIVASA – RAO, 1987).

Em geral existe correlação entre a concentração de hemoglobina e o hematócrito, mas não há diferença estatisticamente significativa pela análise de regressão, desses dois parâmetros, entre peixes de respiração aquática obrigatória e facultativa (VAL, 1999).

Observações em relação ao hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos podem ser bons indicadores sobre a capacidade de transporte de oxigênio dos peixes, permitindo estabelecer relações com a concentração de oxigênio disponível no habitat de origem do animal (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Diversos corantes panóticos podem ser utilizados na coloração de extensões sanguíneas de peixes para identificação e/ou contagem diferencial de leucócitos a exemplo de outros vertebrados. Na literatura internacional a coloração Giemsa ou Giemsa – May – Grünwald são os comumente usados e na literatura nacional, é o corante preconizado por Rosenfeld (1947). Porém muitas vezes necessita-se fazer modificações na técnica de coloração empregada com sucesso na coloração das extensões de lâminas sanguíneas de determinada espécie para que se obtenham bons resultados (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Até o presente momento, conhece-se muito pouco sobre a origem e o desenvolvimento de leucócitos em teleósteos. Os resultados de estudos de hematologia e/ou de órgãos hematopoéticos são pouco conclusivos (TAVARES-DIAS et al., 2000a), mas sugerem que não há diferença na hematopoiese e na formação de células sanguíneas entre os teleósteos dulciaquícolas e marinhos.

Tentativas de se adotar nomenclatura própria para hematologia de peixes foram feitas inicialmente por Jordan (1938) e Jakowska (1959), citado por TAVARES-DIAS & MORAES, 2004. Linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos

são os leucócitos, usualmente observados na circulação dos peixes. Essa denominação é semelhante à empregada em mamíferos e outros vertebrados. Segundo TAVARES-DIAS & MORAES (2004) a padronização da terminologia para os leucócitos é muito importante, visto que há grande divergência, principalmente para granulócitos. Essa situação dificulta a comparação de resultados entre diferentes autores até a mesma espécie, devido à diversidade de técnicas para quantificação e identificação dos leucócitos, a dificuldade da contagem diferencial de leucócitos na distinção morfológica entre linfócitos, monócitos e trombócitos. Portanto, a classificação dos leucócitos está sujeita à interpretação de cada autor, aumentando o conflito de resultados.

Outras dificuldades somam-se a heterogeneidade dos leucócitos, como sugerem estudos morfológicos e citoquímicos e ainda dificuldades em se identificar cada tipo de granulócito somente por coloração de rotina. Portanto o uso combinado de métodos de citometria de fluxo e microscopia eletrônica, permitem uma melhor caracterização e identificação dos tipos celulares (AFONSO et al., 1998)

Os métodos de NATT & HERRICKS (1952) recomendados para aves foram amplamente experimentados na contagem de leucócitos em peixes, porém não permite uma coloração satisfatória na distinção de trombócitos e linfócitos.

Sob microscopia comum, os linfócitos são células predominantemente arredondadas, de tamanho variado, com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, sendo elevada sua relação com o citoplasma. Os linfócitos, em geral, apresentam projeções citoplasmáticas, o que facilita diferenciá-los dos trombócitos nas extensões sanguíneas. (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os linfócitos de peixes participam do processo inflamatório, porém a função dessas células nos peixes não está bem esclarecida e o estudo da sua composição química poderá auxiliar (LAMAS et al., 1994). Métodos citoquímicos demonstram reação positiva para fosfatase alcalina em linfócitos de *O. mykiss*. As fosfatases ácida e alcalina são enzimas catalizadoras de ésteres de fosfato presentes nos diversos tecidos, apresentando uma importância na síntese de proteínas. A fosfatase alcalina está associada à atividade secretora e a fosfatase ácida ao processo fagocítico (AFONSO et al., 1998).

Nos peixes teleósteos os neutrófilos são predominantemente arredondados, cujo citoplasma possui granulações acidofílicas muito finas. O núcleo apresenta forma

de bastonete, ocasionalmente é segmentado e, em geral, excêntrico, sendo a cromatina nuclear pouco compacta e sem nucléolo visível. Possui grande quantidade de grânulos com dimensões reduzidas, com ou sem estrutura cristalóide interna. O núcleo é oval, excêntrico, eventualmente forma lobos incompletos. Em espécies das famílias Anostomidae, Pimelodidae, Erythrinidae, Ictaluridae, mugilidae, Characidae, Prochilodontidae, Cichlidae, Cyprinidae ocorre variação interespecífica no percentual de neutrófilos. Esse granulócito aparece em todas as espécies (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os heterófilos são granulócitos que apresentam inclusões intracitoplasmáticas na forma de grânulos fusiformes ou bastões, os quais coram-se de modo intermediário entra a coloração de eosinófilo e basófilo e possuem funções equivalentes aos neutrófilos, como a fagocitose (GARCIA – NAVARRO & PACHALY, 1994). Não é fácil a identificação deste tipo celular (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Neutrofilia é a resposta mais comum às infecções em peixes. Os neutrófilos de *O. mykiss* são os leucócitos de maior atividade migratória a exemplo do que ocorre em mamíferos. Os neutrófilos podem aderir às células endoteliais e migrar para o foco inflamatório atraídos por quimiotaxinas (AFONSO et al., 1998).

Nos mamíferos (LORENZI, 1999) e em peixes (VALE et al., 2002) os neutrófilos são células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções (THUVANDER et al., 1978; VALE et al., 2002). Estudos com diversas espécies de peixes demonstram a capacidade fagocítica dos neutrófilos sanguíneos e / ou teciduais ao englobar partículas antigênicas e bactérias (THUVANDER et al., 1978; LAMAS et al., 1994; AFONSO et al. 1997; AFONSO et al., 1998; VALE et al., 2002).

Entre as espécies das famílias Anostomidae, Pimelodidae, Erythrinidae, Ictaluridae, Characidae, Prochilodontidae, Cichlidae, Mugilidae e Cyprinidae existe uma variação interespecífica de monócitos. Estimativas demonstram que os menores valores de monócitos ocorrem em *C. carpio*, *Hoplias malabaricus*, *Pileodus maculatus*, *Mugil platanus*, *Colossoma macropomum*.

TAVARES-DIAS & MORAES (2004) relataram o monócito como uma célula arredondada, com citoplasma basofílico, vacuolizado, núcleo em geral excêntrico e alongado ou esférico, foi denominada célula monocitóide. Células com tais características também ocorrem no sangue periférico de *H. malabaricus* e *Astyanax bimaculatus*, ao lado de outras com características de monócitos propriamente ditos –

que são agranulócitos predominantemente grandes, de forma variável e de citoplasma basofílico, na maioria das vezes vacuolizados.

Os monócitos são considerados verdadeiras células em trânsito no sangue periférico (LORENZI, 1999). Porém, alguns autores (ELSAESSER & CLEM, 1986; SCHÜTT et al., 1997) empregaram erroneamente o termo macrófago referindo-se aos monócitos circulantes. Em *Piaractus mesopotamicus* estudo citoquímico de células mononucleares sugere que a diferenciação dessas células em macrófagos ocorre ainda na circulação (PELLIZON et al., 2002). Todavia, estudo da morfogênese de células sanguíneas em *I. punctatus* demonstra que monócitos e macrófagos são células morfológicamente distintas e somente os monócitos podem ser encontrados no sangue circulante, portanto o termo monócito deve ser empregado para células circulantes e macrófagos reservado para células diferenciadas no tecido conectivo (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os macrófagos possuem morfologia variável e são mais ativos que os monócitos dos quais derivam. Assim, em alguns tecidos de mamíferos os macrófagos estimulados adquirem o aspecto de células gigantes poliariontes (LORENZI, 1999).

Reação inflamatória inespecífica e resposta imunológica nas quais ocorre à fagocitose, é de extrema importância nos mecanismos de defesa do hospedeiro, pois os monócitos do sangue periférico transformam-se em macrófagos e migram para o foco inflamatório. Na aquicultura há interesse especial em aumentar a resistência à doenças e o incremento da atividade fagocitária de células de defesa é um aspecto importante. Aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos induzida pela liberação de fatores ativadores de macrófagos resulta da inoculação de patógenos mortos ou de seus produtos assim como da aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os basófilos de *Aristichthys nobilis* são predominantemente arredondados, tem citoplasma rico em granulações finas e corando-se pacromicamente em roxo-azulado. O núcleo geralmente é excêntrico. Apresentam citoplasma irregular, com grandes projeções citoplasmáticas, granulações esféricas, discreta formação de retículo endoplasmático granular e elevada quantidade de mitocôndrias e ribossomos livres. O núcleo apresenta cromatina pouco densa e raramente observa-se nucléolo. À semelhança dos eosinófilos, os basófilos estão presentes no sangue periférico de peixes em baixo percentual e raramente são encontrados (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentados de células anucleadas, os trombócitos de peixes são células completas. Ao microscópio de luz comum são células predominantemente elípticas, com núcleo fusiforme e hipercoreado. Ultraestruturalmente, os trombócitos apresentam formas variadas, semelhantes às aquelas descritas em microscopia comum. O contorno citoplasmático é de maneira geral regular, ocasionalmente possui invaginações e prolongamentos digitiformes (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Vários autores sugerem que, o desenvolvimento de trombócitos ocorra no baço e no rim de peixes teleósteos, e em função da semelhança com os linfócitos, erroneamente os trombócitos são incluídos na contagem diferencial de leucócitos, portanto recentemente, dada a inexistência da técnica adequada para contagem e na tentativa de amenizar tal imperfeição, leucócitos e trombócitos foram incluídos em um único bloco designado como células sanguíneas de defesa orgânica, particularmente quando a abordagem enfoca o ponto de vista da patologia, graças às evidências de sua participação nos mecanismos de defesa (TAVARES-DIAS, 2002; TAVARES-DIAS et al., 2000a; TAVARES-DIAS et al., 2002), entretanto é indiscutível que fisiologicamente leucócitos e trombócitos são derivados de diferentes linhagens celulares.

A composição sanguínea de peixes está sujeita a fatores fisiológicos e ecológicos como o sexo, o estágio de desenvolvimento gonadal, o estresse, as infecções, o peso e o comprimento corporal do peixe (MCCORMICK & NAIMAN, 1985).

Nos teleósteos o leucograma também pode ser influenciado pelo sexo, mas os resultados são controversos. Os basófilos são leucócitos que parecem não sofrer dimorfismo sexual. Em *Clarias batrachus* a contagem de leucócitos e de trombócitos é influenciado pelo sexo (BHATNAGAR & SAKSENA, 1989). Em contrapartida, em *Pimephales promelas* o número de leucócitos e o percentual de trombócitos não sofrem essa influência (THOMAS et al., 1999). Já em *Lepomis macrochirus* somente o percentual de eosinófilos difere entre os sexos (MURRAY, 1984)

O estágio de maturação gonadal pode ser um dos principais fatores fisiológicos responsáveis pelas alterações do quadro sanguíneo de peixes (RANZANI-PAIVA et al., 1998/1999) à semelhança do que ocorre em outros vertebrados.

O crescimento dos peixes é influenciado por fatores ambientais como a temperatura, o fotoperíodo, o nível de oxigênio dissolvido, bem como pela assimilação

de nutrientes. Similarmente os valores hematológicos podem ser influenciados não apenas pelo crescimento, mas também pelas condições ecofisiológicas (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

A técnica de colheita de sangue atua como fonte de variação de resultados no eritrograma, principalmente no hematócrito e na concentração de hemoglobina e no leucograma tais diferenças referem-se ao tipo e uso de anticoagulantes, o uso ou não de anestésicos, a forma de obtenção de sangue, o tempo decorrido entre a colheita sanguínea e as análises e outros fatores. Portanto, quando se pretende determinar valores hematológicos basais todos esses fatores devem ser levados em consideração e padronizados (TAVARES-DIAS & SANDRIN, 1998).

Nos peixes de água doce *C. macropomum* (TAVARES-DIAS & SANDRIN, 1998) o hematócrito e a concentração de hemoglobina do sangue heparinizado são maiores se comparados ao sangue colhido com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA 10%), para um mesmo animal.

Quando o sangue de *Oreochromis aureus* é colhido em frascos contendo heparina concentrada (5000 UI/mL) o número de leucócitos é maior que nos controles, colhidos sem anticoagulante (ALLEN, 1993). A heparina inibe a formação de trombina impedindo a conversão de fibrinogênio em fibrina. Esse anticoagulante natural dos tecidos é o que menos afeta os eritrócitos, mas altera a morfologia dos leucócitos em mamíferos (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994) e interfere com a coloração dos grânulos de leucócitos em teleósteos.

A contagem de eritrócitos totais em hemocitômetros é simples e não requer nenhum diluente especial. Pode ser feita com uso de qualquer diluente corante, apenas para facilitar a visualização dessas células. Assim, pode ser usado como diluente a solução de cloreto de sódio 0,65%, concentração usualmente adotada para peixes de água doce. Porém o diluente desenvolvido por NATT & HERRICKS (1952), especialmente para peixes, não causa distorções nos eritrócitos e por isso é o método recomendado para padronizar métodos hematológicos para peixes. A metodologia de colheita sanguínea adequada é de extrema importância, uma vez que o eritrograma pode sofrer influência quanto ao tipo e uso de anticoagulantes, o uso ou não de anestésicos, a forma e o local de obtenção do sangue, o tempo decorrido entre a colheita do sangue e as análises (TAVARES & MORAES, 2004).

Valores de eritrócitos totais de peixes podem ser afetados por outros poluentes, como em *O. mykiss* após exposição aguda ao alumínio e em *Labeo rohita*,

após exposição a teores subletais de cipermetrina e carbofurano (ADHIKARI et al., 2004). Em adição, CHOWDHURY et al. (2004) discutem que outros mecanismos de toxicidade podem estar associados com a capacidade de transporte de oxigênio, como no caso em que o Cd^{++} , após exposição trófica de *O. mykiss*, interage com hemoproteínas em células que desencadeiam a expressão do hormônio eritropoetina, uma precursora da produção de eritrócitos e hemoglobina durante deficiência de oxigênio (hipóxia). Há evidências de que o $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ tenha causado alterações na atividade hematopoiética e no mecanismo de renovação do estoque de eritrócitos em circulação de *H. malabaricus*, após 70 dias de exposição pela dieta (COSTA, 2006). Sabe-se que alterações nos valores da contagem de leucócitos após exposições a poluentes podem estar associadas a um decréscimo em imunidade não específica de peixes. Observou-se um aumento consistente no valor de leucócitos em *H. malabaricus* expostas ao $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$. E considera-se que este aumento de leucócitos caracteriza uma imuno-estimulação, e relaciona-se com a ocorrência de danos teciduais como necroses, relatadas em diferente tecidos de traíras expostas ao $\text{H}_3\text{C-Hg}^+$ (COSTA, 2006; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002a). Segundo WEDEMEYER et al. (1990) o aumento de leucócitos é reconhecido como um sensível indicador de estresse em peixes, o que também foi constatado por ADHIKARI et al. (2004) em *L. rohita* expostos a pesticidas e por CHOWDHURY et al. (2004) em *O. mikiss* expostos ao Cd^{++} de forma crônica. MATAQUEIRO (2002) não observou alterações hematológicas em pacus expostos ao inseticida paration.

1.3.2) MIGRAÇÃO CELULAR

O sistema imunológico funciona como um sistema vigilante contra invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos ambientais que perturbam a homeostase do organismo, procurando realizar a destruição rápida e eficiente dos mesmos. As células do sistema imune são os leucócitos, células derivadas da medula óssea que incluem células mielóides (neutrófilos polimorfonucleares - PMNs, monócitos, eosinófilos e basófilos) e linfócitos (BROWM, 1997).

Para realizar a função de defesa, as células do sistema imune devem migrar através dos tecidos. Os macrófagos, por exemplo, migram normalmente através dos

tecidos removendo células apoptóticas ou necróticas e proteínas desnaturadas. Uma das características do sistema imune é a migração celular, um processo que exige eventos de adesão transitórios, reguláveis e reversíveis (BROWNE, 1997).

Os fagócitos são os leucócitos responsáveis pela ingestão e degradação da matéria particulada, defendendo contra infecções, e amplamente distribuído ao longo de todos os filos do reino animal. Portanto, também para os vertebrados, incluindo os peixes, os fagócitos integram a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos que tenham ultrapassado as barreiras naturais do hospedeiro (GREENBERG & SILVERSTEIN, 1993). Os fagócitos dos mamíferos são os macrófagos e os granulócitos neutrófilos, e nos peixes, como provavelmente em todos os seres celomados, os macrófagos, em conjunto com os neutrófilos constituem o principal sistema antimicrobiano (AFONSO, 1999).

Um componente importante da imunidade inata considerado é a inflamação. A inflamação é um grupo complexo de moléculas e eventos celulares que são designados para limpar lesões teciduais, facilitar o processo de reparação e proteger o hospedeiro da invasão por microorganismos. A inflamação envolve vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação de plaquetas e infiltração de células fagocíticas no local da lesão (BOLS et al., 2001). Quando ocorre um estímulo inflamatório, os PMNs são as primeiras células que extravasam os vasos sanguíneos através da interação com as células endoteliais. A migração de neutrófilos é um processo multimediado, regulado por vários mediadores liberados no foco inflamatório (PERRETTI, 1997).

Os macrófagos residentes são considerados células de alarme, responsáveis por iniciar a migração de neutrófilos no sítio inflamatório, pois foi demonstrado que esta resposta, induzida por diversos estímulos, depende no número de macrófagos locais, pois a redução do seu número e/ou função através do uso de soro anti-macrófago provoca diminuição na migração de neutrófilos (SOUZA & FERREIRA, 1985). A capacidade de macrófagos alveolares de diversas espécies, em gerar fatores quimiotáticos para PMNs foi confirmado para uma variedade de estímulos, porém, este fato não é restrito a macrófagos alveolares, já que este evento foi observado na cavidade peritoneal em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (RUSSO, 1980).

De acordo com WEDEMEYER et al. (1990), a supressão do sistema imunológico aumenta a susceptibilidade de peixes a patógenos, um aspecto importante quando se considera a presença de xenobiontes em ecossistemas aquáticos. A

imunossupressão foi observada em *A. bimaculatus* expostos ao tributílo-estanho (TBT) após doses similares administradas por via intraperitoneal (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002b), mas não foi observada em *H. malabaricus* após exposição trófica ao TBT (RABITTO et al., 2005).

A maior parte dos macrófagos residentes deriva de monócitos circulantes, os quais são provenientes da divisão de células precursoras, os monoblastos, na medula óssea em mamíferos. Quando os monócitos deixam o sangue circulante e entram nos tecidos, tornam-se macrófagos. Estudos cinéticos quantitativos em mamíferos demonstram que 72% dos monócitos que deixam a circulação tornam-se células de Kupffer (macrófagos localizados no fígado), 25% macrófagos de baço, 15% pulmonares e aproximadamente 7% macrófagos peritoneais (VAN FURTH, 1985).

Como nos mamíferos, os macrófagos dos salmonídeos são células que derivam dos monócitos e são residentes dos tecidos e cavidades naturais (AFONSO, 1999). Os neutrófilos dos salmonídeos são granulócitos fagocíticos, cujo número aumenta rapidamente nos locais lesados ou infectados (AFONSO et al., 1998). Trabalhos *in vitro* mostraram que, nos salmonídeos, os neutrófilos foram capazes de migrar, fagocitar e produzir radicais livres de oxigênio e que este mecanismo foi aumentado após a opsonização (LAMAS & ELLIS, 1994).

Em peixes a resposta inflamatória no sangue já foi avaliada por injeção de carvão coloidal (ELLIS et al., 1976), carragenina (TIMUR et al., 1977), LPS de *Escherichia coli*, querosene e carragenina (WHITE et al., 2004), *Vibrio alginolyticus* (MACARTHUR et al., 1985), parafina líquida (SUZUKI, 1986), LPS de *Escherichia coli* (BRUNETTI et al., 1994), β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* e LPS de *Salmonella typhimurium* (PAULSEN et al., 2001). O conhecimento das características hematológicas é ferramenta fundamental para a discussão sobre a resposta ao estresse e a reação inflamatória, sendo que os peixes respondem de diferentes maneiras de acordo com o estímulo de estresse (CARNEIRO & URBINATI, 1998; MARTINS, 2000; MARTINS et al., 2001; GOMES et al., 2003).

Embora seja conhecido que os neutrófilos estão presentes no baço e rim dos peixes, há pouca referência para neutrófilos fora da circulação. No entanto, AFONSO et al. (1997) relataram que a cavidade peritoneal de truta arco-íris possui uma população celular residente composta por linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Sendo que os macrófagos representavam cerca de 40% e os neutrófilos cerca de 2% do total

de leucócitos peritoneais. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em cavidades peritoneais de mamíferos em repouso (PESTANA, 1994).

Segundo AFONSO et al. (1999) a resposta dos leucócitos fagocíticos à inflamação aguda produzida na cavidade peritoneal da truta arco-íris pela injeção de agentes flogísticos é caracterizada pelo aumento precoce no número de neutrófilos, seguida mais tarde por um aumento menor no número de macrófagos. Relatam também a impossibilidade de se fazer as contagens diferenciais em extensão de lâminas, porém conseguiram quantificar pelo método indireto da neutrofilia peritoneal, utilizando um espectrofotômetro para quantificação da atividade da peroxidase.

No Brasil, MATUSHIMA & MARIANO (1996), MARTINS (2000) e MARTINS et al. (2001) demonstraram a resposta inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de *O. niloticus*, *P. mesopotamicus* e no híbrido tambacu, respectivamente. MATUSHIMA & MARIANO (1996) observaram migração de leucócitos e trombócitos para a bexiga natatória de *O. niloticus* três horas após injeção de carragenina. JENKINS & KLESIUS (1998) verificaram que esqualene foi o irritante que mais provocou migração de leucócitos em *I. punctatus*, sendo que AFONSO et al. (1998) observaram esse efeito com adjuvante incompleto de Freund em *O. mykiss*. Quando MATSUYAMA & IIDA (1999) injetaram *E. coli* morta na cavidade de *O. niloticus* também observaram migração de leucócitos, além de degranulação de células granulares eosinofílicas. CHADZINSKA et al. (2000) e VALE et al. (2002) observaram respectivamente aumento no número de leucócitos na cavidade peritoneal de *C. auratus* e *Dicentrarchus labrax* injetados com tioglicolato e *Photobacterium damsela*. KUROGI & IIDA (2002) estudando os efeitos do implante de cortisol em tilápia injetada com *E. coli* na bexiga natatória verificaram que a manutenção do hormônio no sangue dos peixes reduziu o número de leucócitos.

Os estudos sobre a resposta inflamatória em trutas e carpas demonstraram que a carragenina (MARTINS, 2000) e o LPS são os principais estimuladores da migração de células até o momento. Apesar do tioglicolato também estimular, algumas vezes seus valores equivalem se aos controles (MARTINS et al., 2001).

1.3.3) CULTIVO CELULAR

Os fagócitos envolvidos na resposta inflamatória, que acompanha a infecção são sempre fagócitos estimulados. Os macrófagos dos peixes como os dos mamíferos são suscetíveis de serem ativados quer *in vivo*, quer *in vitro* (SECOMBES, 1987), distendendo-se, aumentando a sua aderência a superfícies plásticas ou de vidro, fagocitando rapidamente, desencadeando a explosão respiratória com produção do anion superóxido e de outros radicais de oxigênio, e aumentando a sua capacidade bactericida e larvicida (SECOMBES & FLETCHER, 1992).

No contexto da interação/cooperação entre macrófagos e neutrófilos, é importante ressaltar que os dois fagócitos provêm de uma célula precursora em comum. O tipo de interação/cooperação que foi observada nos exsudatos peritoneais inflamados de truta e de robalo, exsudatos em que os dois fagócitos coexistem em número elevado, foi à transferência de neutrófilos e de material neutrofilico para os macrófagos (AFONSO et al., 1998). Esta transferência pode representar uma vantagem adicional para o hospedeiro, inclusive porque o macrófago é uma célula de vida muito mais longa que a do neutrófilo.

O conjunto de atividades desenvolvidas pelos fagócitos tem como passo final a sua morte. Terminado o período em que estes leucócitos são chamados a intervir, e em parte por eles próprios poderem representar um perigo para o hospedeiro, a sua entrada em apoptose é essencial, de forma a que a normalidade seja restabelecida. Portanto a apoptose ou morte celular programada é um conceito funcional da maior importância numa estratégia de eliminação das partes (células desnecessárias), em favor da sobrevivência do todo (o indivíduo) (COHEN & DUKE, 1992). O neutrófilo aumenta drasticamente em curto espaço de tempo nos focos inflamatórios, por outro lado, trata-se de um leucócito com elevada citotoxicidade, a qual pode afetar o próprio hospedeiro. Portanto a apoptose tem particular importância para que os níveis de neutrófilos alcancem os valores mínimos após a inflamação (AFONSO, 1999).

AFONSO (1999) mostrou que ocorreu extensa apoptose dos neutrófilos, quando exsudatos peritoneais inflamatórios foram incubados *in vitro*, em meio de cultura de células. Tanto os neutrófilos como os corpos apoptóticos do neutrófilo foram fagocitados pelos macrófagos presentes nas suspensões leucocitárias.

A explosão respiratória que acompanha a fagocitose consiste numa modificação do tipo e magnitude da respiração, da qual resulta a redução do oxigênio pelo sistema transmembranar da NADPH oxidase, com a formação de vários produtos tóxicos. Esta explosão respiratória pode ser desencadeada pelas partículas fagocitadas (bactérias, restos celulares, etc) e por fatores solúveis (peptídeos, fatores complementos, ionóforos, endotoxinas, detergentes e outros) (AFONSO et al., 1998).

Moléculas biológicas podem ativar os fagócitos dos peixes incluindo os salmonídeos, como LPS das paredes das bactérias Gram negativas, acetato de forbol miristato e microorganismos vivos ou mortos (SECOMBES, 1994). A Ativação dos fagócitos do ponto de vista funcional, aumentam o volume celular, o espalhamento e a aderência ao vidro e ao plástico. Portanto a quimiotaxia, a capacidade fagocítica e a explosão respiratória podem ser avaliadas por quimioluminescência ou pela produção de radicais livres de oxigênio (O_2 ou HO^{\cdot}) (SECOMBES, 1994).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização gasosa que sofre rápida difusão através das membranas celulares e que regula uma ampla variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo o sistema cardiovascular, a inflamação e as funções imunes e neuronais. As primeiras observações relativas ao papel biológico do NO de produção endógena foram feitas em macrófagos e neutrófilos de roedores. A exposição dessas células *in vitro* à endotoxina LPS determinou a liberação de quantidades significativas de óxido nítrico no meio de cultura celular. Além disso, a injeção da endotoxina *in vivo* produziu aumento da excreção urinária de nitrito e nitrato, os dois produtos de oxidação de óxido nítrico. Foi constatado que esse óxido nítrico origina-se da oxidação do grupo guanidino da L-arginina (MONCADA et al., 1991). O primeiro intermediário ativo formado na explosão respiratória é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual sofre uma dismutação, quer de forma espontânea, quer pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), formando oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KLEBANOFF, 1988). Parece que o NO exerce maior efeito na imunidade inespecífica do que na específica, exibindo atividade citostática ou citocida contra uma notável amplitude de microorganismos patogênicos. A óxido nítrico-sintase (NOS) é a enzima da família responsável pela síntese do NO. Três isoformas de NOS são descritas, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (cNOS) (MONCADA et al., 1991).

Temperaturas fora da zona de valores a que o peixe está aclimatado, em geral inibem as funções dos fagócitos. Situações de estresse, carência alimentar e

algumas doenças podem diminuir a atividade do sistema imunológico dos peixes, como também, a presença de certos poluentes na água tem efeitos supressores sobre a atividade dos fagócitos dos peixes (SECOMBES & FLETCHER, 1992).

WANG et al. (1995) foram os primeiros a demonstrar indução da produção de óxido nítrico por macrófagos de peixes. Contudo já foram descritos alguns estudos com cultivos de macrófagos de várias espécies de peixe *in vitro*, envolvendo parâmetros funcionais como fagocitose, morte bacteriana, produção de radicais de oxigênio e produção de óxido nítrico (NO). Estas funções podem ser ativadas através de exposição a vários tipos de estímulos inclusive LPS, fator ativador de macrófagos (MAF) e metais pesados (SARMENTO et al., 2004; NEUMANN et al., 2000; TAFALLA & NOVOA, 2000; ROSZELL & RICE, 1998; WANG et al., 1995). Modulação de atividade de macrófagos de peixe através xenobiontes também foi relatada, mostrando efeitos diversos, dependendo da dose e do tipo químico (ZELIKOFF et al., 1995; BOLS et al., 2001).

2) OBJETIVOS

2.1) OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos toxicológicos agudos do inseticida deltametrina em *Ancistrus multispinis* através de estudos “*in vivo*” e “*in vitro*”.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o *A. multispinis* como modelo animal para estudos toxicológicos;
- b) Determinar a atividade das enzimas colinesterase, GST e EROD em *A. multispinis* expostos a doses subletais de deltametrina;
- c) Padronizar a técnica de migração celular para a espécie *A. multispinis*;
- d) Analisar a influência do tempo e da dose do LPS e da deltametrina em *A. multispinis*;
- e) Analisar a influência do LPS sobre a migração de leucócitos no sangue e líquido peritoneal de *A. multispinis*;
- f) Analisar o efeito da deltametrina na migração celular no sangue e líquido peritoneal associado ou não por LPS em *A. multispinis*;
- g) Analisar a produção de óxido nítrico através da estimulação de macrófagos “*in vitro*” de *A. multispinis*.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) ESPÉCIE UTILIZADA

A espécie escolhida foi um peixe fluvial nativo da região sul do Brasil, o *Ancistrus multispinis* (REGAN, 1912), vulgarmente conhecido como cascudo. *A. multispinis* pertence à família Loricariidae, ordem Siluriforme e classe Actinopterygii (FISCH-MULLER, 2003). Os exemplares foram coletados em uma área limpa, classe II, do litoral paranaense (Resolução do CONAMA nº. 20), mais precisamente no Rio Nhundiaquara (IAP, 1989-1992), localizado no Município de Morretes, estado do Paraná. A coleta foi realizada no período noturno com auxílio de tarrafas. Os animais foram transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR.

O cascudo é um peixe bastante rústico, com revestimento ósseo dorsal que o protege de ataques de predadores. Possui o hábito de viver em corredeiras, no entanto sua boca funciona como ventosa, que lhe permite aderir aos objetos. Alimenta-se de algas, de resíduos e de limos. Possui hábitos noturnos, vive em águas com temperatura entre 18 a 26°C e pH em torno de 7,0.

3.2) ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES

Os peixes foram mantidos por um período mínimo de 30 dias para aclimatarem-se em aquários-estoque com 120 litros de capacidade. Estes aquários foram mantidos com aeração e filtração biológica, temperatura constante (18 - 20°C), pH 7, fotoperíodo de 12 horas e foram alimentados com ração comercial (Alcon Artemia® e Alcon Vegetal®), uma vez ao dia.

Antes dos experimentos os peixes foram pesados e medidos.

3.3) DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES

A procedência e doses das drogas, bem como os componentes das soluções utilizadas encontram-se descritas no apêndice.

3.4) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.1) 1º ETAPA – EFEITO AGUDO DA DELTAMETRINA NOS PARÂMETROS ENZIMÁTICOS E HISTOPATOLÓGICO EM *A. multispinis*

Após aclimação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em aquários (30 litros), com dez animais cada, de acordo com o protocolo experimental abaixo:

- a) os peixes pesaram em média $18 \pm 6,39$ g e mediram em média $12 \pm 1,36$ cm;
- b) as doses subletais de deltametrina utilizadas foram de 0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹, previamente determinadas em experimentos laboratoriais anteriores (foi determinado a DL₅₀ em 96 horas igual 0,5 mg.kg⁻¹) e os animais do grupo controle receberam apenas os solventes (tween 80 e salina nas mesmas concentrações de dissolução da deltametrina – grupo veículo), via intraperitoneal;
- c) os animais permaneceram expostos a deltametrina nos aquários testes por um período de 96 horas, nas mesmas condições padrões de aclimação, incluindo a alimentação diária;
- d) após 96 horas os animais foram sacrificados por secção da coluna vertebral;
- e) amostras de fígado, músculo axial e brânquias foram retirados para serem processados para as análises enzimáticas;

- f) amostras de fígado também foram fixadas em solução Alfac para análise histopatológica.

3.4.1.1) COLINESTERASE (ChE)

O músculo axial foi utilizado para a medida da atividade da ChE, sendo que as amostras foram armazenadas individualmente a -70°C . O procedimento para a homogeneização do músculo foi realizado da seguinte maneira:

- a) as amostras foram descongeladas em gelo;
- b) 250 mg do músculo foram adicionadas em tubos para homogeneização com 2 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,5;
- c) as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador automático Potter-Elvehjem e transferidas individualmente para eppendorf;
- d) o homogenado foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos;
- e) o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -70°C para análise de proteína e da atividade da colinesterase.

A atividade da ChE foi medida segundo o método de ELLMAN et al., (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). É baseado na hidrólise da acetilcolina pela ChE, originando colina que, combinando-se com 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB), produz um composto de coloração amarela, medido em espectrofotômetro a 415 nm. Para a realização da análise, o extrato tecidual foi diluído a 1:40 e pipetado (50µL) nas cavidades da microplaca (quatro repetições). O DTNB preparado a 0,75 mM foi adicionado (200µL) a cada amostra. O substrato iodeto de acetilcolina foi preparado a 9mM e adicionado (50µL) a cada cavidade imediatamente antes da leitura no espectrofotômetro a 405 nm. A atividade foi calculada em $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.4.1.2) ETOXIRESORUFINA-*O*-DEETILASE (EROD)

Para análise da atividade da EROD, o fígado foi processado para a extração da fração S₉, utilizando metodologias descritas por STEGEMAN et al. (1979) e STEGEMAN & HAHN (1994). Portanto, o fígado foi processado da seguinte maneira:

- a) as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido (pool de 3 fígados) e descongeladas em gelo;
- b) foi adicionado cerca de 3 mL de solução tampão (fosfato de potássio 0,1M, pH 7,4) e as amostras foram homogeneizadas individualmente (homogeneizador automático Potter-Elvehjem);
- c) o homogenado foi dividido em dois eppendorfs para serem centrifugados (20 minutos a 10.000 x g a 4°C);
- d) o sobrenadante foi separado (fração S₉) e o pellet desprezado. 500 µL do sobrenadante foram aliquotados (100 µL cada) e armazenados a -70 °C para as análises da concentração da proteína e atividade da EROD;

A atividade da EROD foi medida segundo o método de BURKE & MAYER (1985), modificado por SILVA DE ASSIS (1998) e NICARETTA (2003). O princípio do método consiste na detecção fluorimétrica do produto final (resorufina), depois de uma reação de oxigênio-de-etilação, corresponde a resorufina produzida por unidade de tempo. A reação foi medida no espectrofluorímetro Shimadzu e calculada usando a curva padrão de resorufina. No momento da análise, uma das frações foi descongelada sob o gelo, pipetada 50 µL da amostra mais 420 µL de solução tampão Tris-NaCl na própria cubeta do equipamento, e em seguida foi incubada a 27°C por 5 minutos no espectrofluorímetro (três repetições). Após este período, foi adicionado 30µL de NADPH (2,6 mM), iniciando a reação. Esta reação foi lida no comprimento de onda de 530 nm e de extinção de 590 nm, com abertura da fenda da luz de 3 mV durante 15 minutos. A concentração da resorufina de cada amostra foi calculada pela média de duas medidas. A atividade foi calculada em pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

3.4.1.3) GLUTATIONA S – TRANSFERASE (GST)

Os arcos branquiais foram utilizados para a medida da atividade da GST, sendo que foram armazenados individualmente a -70°C. Foram descongelados e em seguida homogeneizados em 500 µL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 por 30 segundos (homogeneizador automático Potter-Elvehjem). O homogenado foi centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante armazenado a -70 °C para as análises da concentração da proteína e atividade da GST.

Para a atividade da GST foi utilizada a metodologia de HABIG et al. (1974). A amostra foi diluída em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 (1:3). Adicionou-se nos poços da microplaca 100 µL da amostra (quatro repetições) e 200 µL da solução de GSH mais 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) preparado a 3 mM. Em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 340 nm. As leituras foram realizadas com intervalo de 15 segundos por 3 minutos. A atividade foi calculada em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.4.1.4) ANÁLISE PROTEÍCA

A concentração de proteína de todas as amostras foi analisada pelo método de BRADFORD (1976). As amostras foram diluídas em tampão (1:20) e foi utilizado soro albumina bovina como padrão. Nos poços da microplaca foram adicionados 10 µL da amostra e 250 µL da solução de Bradford (quatro repetições), e a leitura realizada e espectrofotômetro a 575nm.

3.4.2) 2º ETAPA – PADRONIZAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR E EFEITOS DA DELTAMETRINA NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DO EXSUDATO PERITONEAL EM *A. multispinis*

Para realizar a migração celular em *A. multispinis* utilizou-se a mesma metodologia utilizada para experimentos de migração celular em ratos adaptado por AFONSO et al. (1997) para trutas arco-íris e adaptada para a espécie utilizada.

3.4.2.1) PARAMÊTROS HEMATOLÓGICOS

A colheita sanguínea foi realizada por punção cardíaca, na presença de EDTA 3%, utilizando agulha hipodérmica 20 x 5,5 mm. Foram realizadas contagens total e diferencial (extensão em lâminas, coradas com corante Rosenfeld) de células sangüíneas usando a metodologia e nomenclatura descrita por TAVARES-DIAS et al. (1999a,b; 2000 a, b) e NATT & HERRICKS (1952). O sangue foi diluído (1:40) em corante Natt/Herrick's e a contagem total de células foi realizada em microscópio ótico (MO). As contagens de leucócitos e eritrócitos foram feitas manualmente com hemocitometro (COLLIER, 1944). Verificou-se também espectrofotometricamente a taxa de hemoglobina (5 mL líquido de cianometahemoglobina + 20 µL sangue), segundo ELLIS (1977) e a taxa de hematócrito utilizando tubos de microhematócrito HINE (1992).

Em paralelo, o sangue de 32 animais foi retirado para estabelecer valores hematológicos referenciais para o *A. multispinis*, tais como: número total de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, taxa de hemoglobina e valor do hematócrito, seguindo a metodologia descrita acima. Para este experimento os peixes pesaram em média $16 \pm 5,3$ g e mediram em média $12 \pm 1,25$ cm.

3.4.2.2) PARAMÊTROS DO EXSUDATO PERITONEAL

Para a colheita do exsudato peritoneal utilizou-se o procedimento adaptado de ratos (SILVA et al., 1987). O peritônio foi previamente limpo com etanol, e foi injetado PBS (solução de tampão salina), através de agulha hipodérmica 20 x 5,5 mm, na linha ventral do peritônio (entre a barbatana pélvica e a peitoral). O volume de PBS

injetado foi ajustado para o tamanho do peixe, entre 2-3 mL. A área foi então massageada por 30 segundos para dispersar as células peritoneais no injetado de PBS. Rapidamente, as células suspensas e contidas no PBS intraperitoneal, foram coletadas usando seringa (3mL) e agulha hipodérmica de inox 13 x 5,5 mm (perfurada). A amostra foi conservada em gelo até ser processada. Foi realizada a contagem total de leucócitos usando corante Natt/Herrick's (1:20) em MO, segundo NATT & HERRICKS (1952), e nomenclatura descrita por TAVARES-DIAS & MORAES (2004). Os lavados hemorrágicos foram descartados.

3.4.2.3) EFEITO DOSE E TEMPO / RESPOSTA

Para analisar a influência do tempo e da dose do agente flogístico foram utilizados 5 grupos experimentais, sendo um controle ou veículo (tween 80 + solução salina) e quatro doses de LPS (0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, via intraperitoneal). Após 1, 3, 6 e 24 horas da administração foi realizado a colheita sangüínea e a colheita do exsudato peritoneal. Cada grupo continha 12 peixes, sendo que em cada horário realizava-se a coleta em três peixes.

3.4.2.4) EFEITOS DA DELTAMETRINA NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E NO EXSUDATO PERITONEAL SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO POR LPS

Os peixes foram intoxicados nas doses subletais de 0,1 e 0,3 mg.kg^{-1} de deltametrina por 96 horas por via intraperitoneal. O LPS foi injetado por via intraperitoneal, 4 horas antes da colheita sangüínea na dose de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e para o exsudato peritoneal foi de 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Foram utilizados seis tratamentos utilizando 10 peixes em cada grupo [veículo, deltametrina 0,1 mg.kg^{-1} (DM0,1), deltametrina 0,3 mg.kg^{-1} (DM 0,3), LPS (veículo), LPS + deltametrina 0,1 mg.kg^{-1} (LPS + DM0,1) e LPS + deltametrina 0,3 mg.kg^{-1} (LPS + DM0,3)], nos dois experimentos.

Antes dos experimentos de análise hematológica e exsudato peritoneal, os peixes foram pesados e medidos, pesando em média $17 \pm 3,49$ g e $16 \pm 4,5$ g e medindo em média $13 \pm 1,3$ cm e $12 \pm 1,45$ cm, respectivamente.

3.4.3) 3º ETAPA – CULTIVO CELULAR EM *A. multispinis*

3.4.3.1) ESTERILIZAÇÃO

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127°C por 30 minutos ou adquiridos estéreis.

3.4.3.2) PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE MONOCAMADAS DE MACRÓFAGOS

As etapas descritas a seguir referente às preparações dos sobrenadantes, foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por NEUMANN et al. (1995) e por SARMENTO et al. (2004) e adaptadas para o *A. multispinis*.

Antes dos experimentos os peixes foram pesados e medidos, pesando em média $16 \pm 3,51$ g e medindo em média $13 \pm 1,31$ cm.

Os macrófagos foram obtidos do rim de *A. multispinis* (pool de 8 peixes). Após a retirada dos rins assepticamente, foram colocados em meio de cultura L15 (Cultilab), 2% soro fetal bovino (Cultilab), 1% penicilina / estreptomicina (Cultilab) e 20 U.mL⁻¹ heparina e mantidos em gelo. Em seguida a amostra foi macerada e para a separação dos macrófagos foi centrifugado em Percoll (Cultilab) (40 – 60%) (400 x g por 30 minutos sob refrigeração 4°C). Após lavou-se duas vezes centrifugando 400 x g por 10 minutos e sob refrigeração 4°C. Após a lavagem e centrifugação, as células foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para 2.10^6 células.mL⁻¹ e

ressuspensos em meio L-15 (Cultilab), 0,1% Soro fetal bovino (Cultilab); 1% penicilina / estreptomicina (Cultilab) e 20 U.mL⁻¹ de heparina.

Os macrófagos isolados foram colocados em placa de cultivo celular de 96 poços, mantendo o volume por poço em 100µL e incubados por 24 horas entre 20 - 22°C para ocorrer à aderência. Após a incubação e a aderência o sobrenadante foi retirado, e as monocamadas foram lavadas três vezes com PBS estéril para peixe.

3.4.3.3) ESTIMULAÇÃO “*IN VITRO*” DOS MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE LPS

Com a finalidade de verificar qual dose de LPS seria utilizada na estimulação dos macrófagos de *A. multispinis*, primeiramente foi realizado um experimento piloto. As monocamadas de macrófagos aderidas, contendo 2 x 10⁶ células viáveis por mililitro de meio L-15, foram incubadas com LPS nas doses de 1 e 10 µg.mL⁻¹, por 48 horas a 20 - 22°C a fim de que ocorresse a estimulação dos macrófagos.

Ao final destas incubações, os meios de culturas contendo LPS foram desprezados e as monocamadas lavadas 3 vezes com PBS estéril. As células foram então, novamente incubadas com meio durante 1 hora para que ocorresse a liberação de produtos de macrófagos no sobrenadante. Nesta etapa o meio de cultura estava isento de LPS. A monocamada foi mantida para continuidade dos experimentos de avaliação da viabilidade.

3.4.3.4) ESTIMULAÇÃO “*IN VITRO*” DOS MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE DEXAMETASONA

Com a finalidade de verificar se os macrófagos de peixes reagem da mesma forma que os macrófagos de mamíferos frente a dexametasona, foi realizado outro

experimento piloto. As monocamadas de macrófagos aderidas contendo 2×10^6 células viáveis por mililitro de meio L-15 foram incubadas, contendo dexametasona na dose 0,3 e 0,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e LPS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por 48 horas a 20 - 22°C a fim de que ocorresse a estimulação dos macrófagos.

Ao final destas incubações os meios de culturas contendo LPS e dexametasona foram desprezados e as monocamadas lavadas 3 vezes com PBS estéril. As células foram então novamente incubadas com meio durante 1 hora para que ocorresse a liberação de produtos de macrófagos no sobrenadante. Nesta etapa o meio de cultura estava isento de LPS e dexametasona. A monocamada foi mantida para continuidade dos experimentos de avaliação da viabilidade.

3.4.3.5) ESTIMULAÇÃO “*IN VITRO*” DOS MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE DELTAMETRINA

As monocamadas de macrófagos aderidas contendo 2×10^6 células viáveis por mililitro de meio L-15 foram incubadas, contendo somente meio e deltametrina na dose 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, deltametrina na dose 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, LPS na dose 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, LPS na dose 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ associado a deltametrina 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e LPS na dose 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ associado a deltametrina 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 48 horas a 20 - 22°C a fim de que ocorresse a estimulação dos macrófagos.

Ao final destas incubações os meios de culturas contendo LPS e deltametrina foram desprezados e as monocamadas lavadas 3 vezes com PBS estéril. As células foram então novamente incubadas com meio durante 1 hora para que ocorresse a liberação de produtos de macrófagos no sobrenadante. Nesta etapa o meio de cultura estava isento de LPS ou deltametrina. A monocamada foi mantida para continuidade dos experimentos de avaliação da viabilidade.

3.4.3.6) AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico produzido pelos macrófagos é um radical livre instável sendo rapidamente convertido a nitrito, o qual reage com o reagente de Griess, formando um produto cuja absorbância em 550 nm, pode ser relacionada à concentração de óxido nítrico.

Primeiramente preparou-se a curva padrão de nitrito em uma placa de 96 poços com soluções de 100 μL de NaNO_2 em concentrações que variavam de 0 a 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Estas soluções foram misturadas a 200 μL do reagente de Griess. Após 10 minutos de reação, a absorbância para obtenção da curva padrão, para dosagem de óxido nítrico foi lida a 550 nm, em espectrofotômetro.

O óxido nítrico produzido pelos macrófagos foi quantificado com o uso do reagente de Griess, preparado como descrito STUEHR & MARLETTA (1985). Para obtenção deste reagente, foram preparadas soluções estoque de cloreto de naftiletilenodiamina 0,1% (p/v) dissolvido em água destilada e de sulfanilamida a 1% (p/v) dissolvida em H_3PO_4 5% (v/v). Pouco antes do uso, as soluções foram misturadas na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito.

Após a incubação dos macrófagos nas condições já descritas, 100 μL do meio sobrenadante de cada cavidade foram transferidos, na mesma ordem, para uma placa idêntica e foi adicionado 200 μL do reagente de Griess. Após 10 minutos, a absorbância foi lida em 550 nm, e a quantidade de óxido nítrico produzida é expressa em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.4.3.7) VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO DE EXCLUSÃO DE CORANTE

Para a determinação do número de células viáveis presentes nas placas utilizou-se o método descrito por HANKS & WALLACE (1958). As células foram retiradas de três cavidades com tripsina 25% (SIGMA) e ressuspensas em meio de cultura a fim de avaliar o número total de células aderidas, no momento e 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após administração de LPS ou deltametrina. Esta suspensão (6 μL) foi

misturada ao corante eosina-amarela 1% (6 μ L). Após alguns segundos as células foram avaliadas em microscopia de luz. A avaliação deu-se através da contagem de 100 células determinando-se a porcentagem de células viáveis. Foram consideradas viáveis as células onde não se evidenciou a presença do corante no citoplasma.

3.4.3.8) VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO DO MTT

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizada a análise colorimétrica com o corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este corante na forma oxidada possui cor amarela na qual se torna reduzido e de coloração azulada em células ditas viáveis. Esta coloração é feita pelas mitocôndrias por desidrogenases mitocondriais das células viáveis adquirindo coloração azulada, ou seja, o MTT é reduzido a formazan, que precipita sobre as células viáveis (TADA et al., 1986). Após 48 horas de incubação e retirada das amostras das placas utilizadas nos estudos *in vitro*, tratados ou não com LPS (10 μ g.mL⁻¹), com dexametasona (0,3 e 0,9 μ g.mL⁻¹) ou com deltametrina (0,3 e 1 μ g.mL⁻¹), foi adicionado 100 μ L de MTT (1mg.mL⁻¹) e a placa foi novamente incubada. Após 2 horas a reação foi bloqueada com solução de SDS 10% acídica. A medida de absorbância foi realizada após 10 minutos no comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro, segundo SARMENTO et al., 2004.

3.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foi utilizada a análise de variância a um critério (ANOVA ONE – WAY), caso encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi aplicado. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha = 0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 3.00 for Windows, San Diego – Califórnia, EUA.

4) RESULTADOS

4.1) ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM *A. multispinis*

4.1.1) COLINESTERASE

A atividade da colinesterase aumentou significativamente nos grupos tratados com deltametrina em relação ao grupo veículo. A atividade foi aproximadamente 30% maior no grupo intoxicado com a dose 0,1 mg.kg⁻¹ e 36% maior no grupo intoxicado com a dose 0,3 mg.kg⁻¹ do que o grupo veículo (Figura 1).

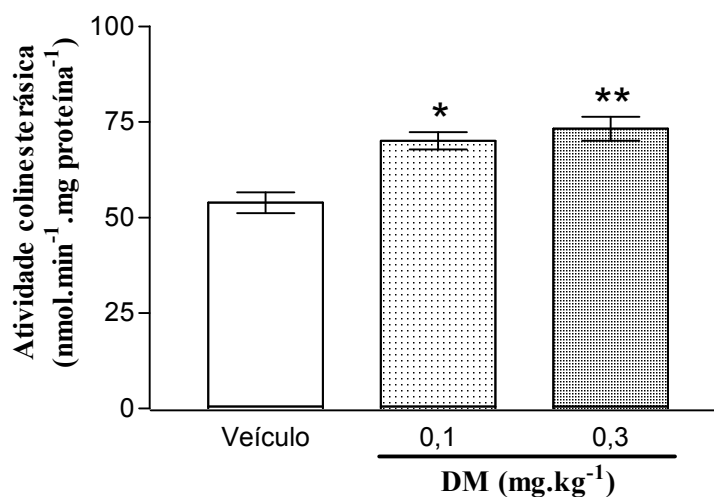


Figura 1: Efeito da deltametrina (DM) sobre a atividade colinesterásica de *A. multispinis*. Os animais receberam DM (0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹, i.p.) 96 horas antes da coleta das amostras de músculo axial. O grupo veículo recebeu somente tween 80 + solução salina. As barras indicam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) da atividade colinesterásica medida em nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ de dez animais em quadruplicata. * p < 0.01 em relação ao grupo veículo; ** p < 0,001 em relação ao grupo veículo.

4.1.2) ETOXIRESORUFINA-*O*-DEETILASE

Atividade da EROD foi em média $2,27 \pm 0,01$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$, n\u00e3o apresentando diferen\u00e7a significativa entre o grupo ve\u00edculo e os grupos tratados com deltametrina 0,1 e 0,3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Figura 2).

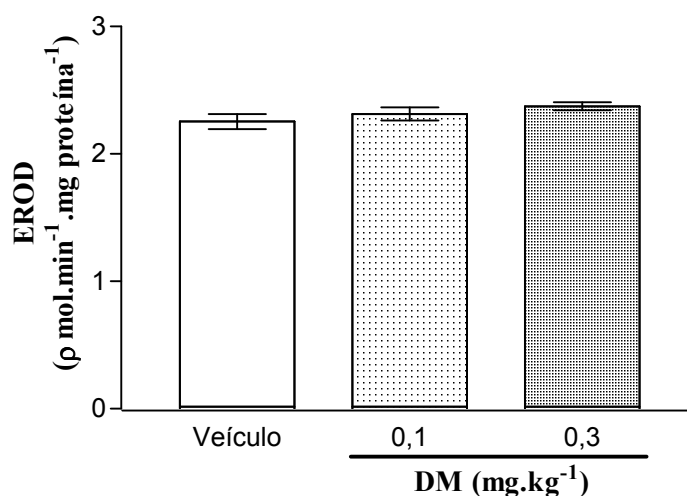


Figura 2: Efeito da deltametrina (DM) sobre a atividade da EROD de *A. multispinis*. Os animais receberam DM (0,1 e 0,3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.), 96 horas antes da coleta do f\u00edgado. O grupo ve\u00edculo recebeu somente tween 80 + solu\u00e7\u00e3o salina. As barras indicam a m\u00e9dia \pm erro padr\u00e3o da m\u00e9dia (e.p.m.) da atividade da EROD medida em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ de um pool de 3 animais em triplicata. N\u00e3o houve diferen\u00e7a significativa entre os grupos.

4.1.3) GLUTATIONA *S*-TRANSFERASE

De acordo com a Figura 3, pode-se observar que houve uma redu\u00e7\u00e3o significativa da GST, em torno de 61% do grupo tratado com deltametrina na dose de 0,3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, em rela\u00e7\u00e3o ao grupo ve\u00edculo. Mostrando que quando se aumenta a dose da deltametrina diminui a atividade da GST.

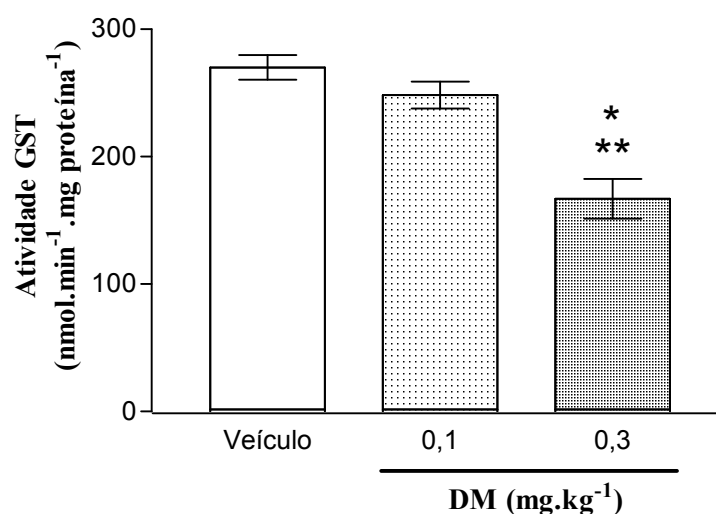


Figura 3: Efeito da deltametrina (DM) sobre a atividade da GST de *A. multispinis*. Os animais receberam DM (0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹, i.p.), 96 horas antes da coleta das amostras de brânquias. O grupo veículo recebeu somente tween 80 + solução salina. As barras indicam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) da atividade da GST medida em nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ de dez animais em quadruplicata. * p < 0.01 em relação ao grupo DM 0,1 mg.Kg⁻¹; ** p < 0,001 em relação ao grupo veículo.

4.2) MIGRAÇÃO CELULAR EM *A. multispinis*

Os parâmetros hematológicos e do exsudato peritoneal, que são resultados da migração celular, serão apresentados a seguir:

4.2.1) DOSE E TEMPO RESPOSTA DO LPS EM *A. multispinis* – PARÂMÊTROS HEMATOLÓGICOS

De acordo com os resultados obtidos (Figura 4 e 5), podemos verificar que a dose de 100 μ g.kg⁻¹ de LPS foi estatisticamente significativa para migração de leucócitos no sangue em relação ao grupo controle após 4 horas da administração. A migração de leucócitos no sangue foi maior após 3 horas de estimulação com o LPS, mas também ocorreu com 6 horas após. De acordo com este resultado foi seguido o

mesmo padrão utilizado para ratos e também a metodologia baseada em experimentações similares com trutas arco-íris (AFONSO et al., 1997), que foi utilizado o período de 4 horas para avaliar a migração celular. Portanto para todas as experimentações onde os parâmetros hematológicos foram avaliados foi utilizada a dose de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de LPS e as amostras sanguíneas coletadas após 4 horas da estimulação.

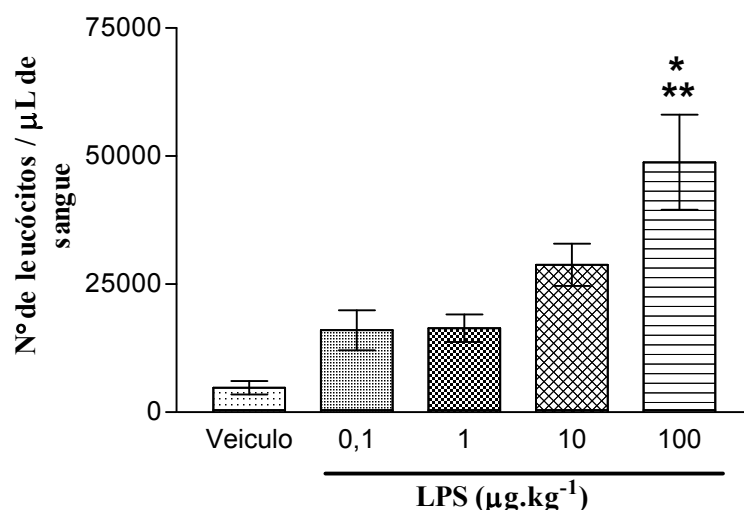


Figura 4: Curva dose resposta de LPS sobre o número de leucócitos do sangue de *A. multispinis*. Os animais receberam LPS nas doses de 0,1, 1, 10 e $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (i.p.), 4 horas antes das coletas. As barras indicam a média \pm e.p.m. do número de leucócitos/ μL de sangue de três animais. * $p < 0,01$ em relação aos grupos 0,1, 1 e $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (LPS); ** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo.

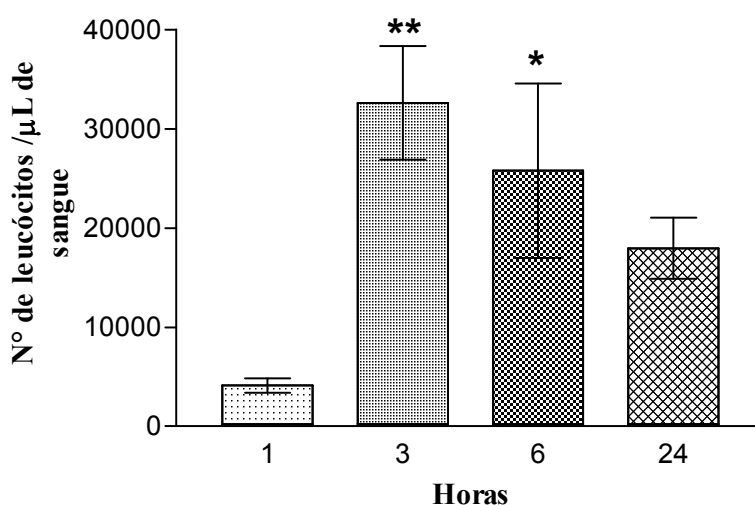


Figura 5: Influência do tempo sobre o número de leucócitos no sangue induzido por LPS em *A. multispinis*. As amostras foram coletadas 1, 3, 6 e 24 após os animais receberem LPS ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$, i.p.). As barras indicam a média \pm e.p.m.

do número de leucócitos/ μL de sangue de três animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo 1 hora.

4.2.2) DOSE E TEMPO RESPOSTA DO LPS EM *A. multispinis* – PARÂMETROS DO EXSUDATO PERITONEAL

De acordo com a Figura 6, podemos verificar que a dose de $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de LPS (i.p.) foi estatisticamente significativa para migração de leucócitos para o peritônio, após 4 horas da administração em relação ao grupo controle (veículo). A migração de leucócitos no exsudato peritoneal foi maior e significativa 3 horas após a estimulação com o LPS, houve também um aumento após 6 horas de estimulação (Figura 7), porém não foi significativa. De acordo com este resultado foi seguido o mesmo padrão para ratos e também a metodologia baseada em experimentações similares com trutas arco-íris (AFONSO et al., 1997), que foi utilizado o período de 4 horas para avaliar a migração celular. Portanto para todas as experimentações onde os parâmetros da migração peritoneal foram avaliados foi utilizada a dose de $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de LPS e as amostras coletadas após 4 horas da estimulação.

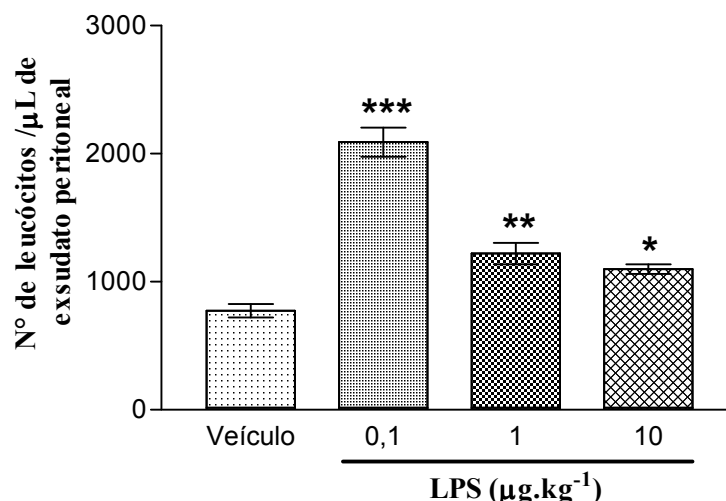


Figura 6: Curva dose resposta de LPS sobre a migração de leucócitos na cavidade peritoneal de *A. multispinis*. Os animais receberam LPS nas doses de 0,1, 1 e $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (i.p.), 4 horas antes das coletas. As barras indicam a média \pm e.p.m. do número de leucócitos/ μL de exsudato peritoneal de três animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo.

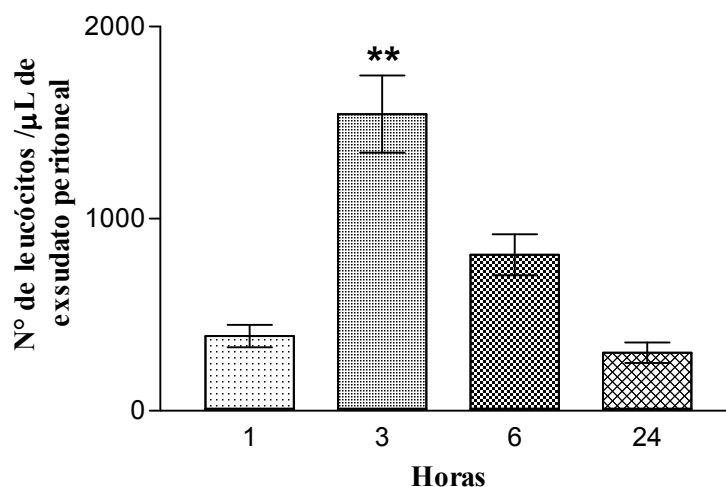


Figura 7: Influência do tempo sobre a migração de leucócitos na cavidade peritoneal induzido por LPS em *A. multispinis*. As amostras foram coletadas 1, 3, 6 e 24 após os animais receberem LPS ($0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, i.p.). As barras indicam a média \pm e.p.m. do número de leucócitos/ μL de exsudato peritoneal de três animais. ** $p < 0,001$ em relação ao grupo 1, 6 e 24 horas.

4.2.3) VALORES HEMATOLÓGICOS BASAIS DE *A. multispinis*

Os valores basais médios e erro padrão da média da contagem de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) encontrados em *A. multispinis* estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios e erros padrão da média de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito, em *A. multispinis* (cascudo) (n= 32):

Parâmetros	Média \pm EPM
Eritrócitos (células/ μ L)	451.800 \pm 25760
Hemoglobina (g/dL)	4,22 \pm 0,18
Hematócrito (%)	7,41 \pm 0.92
VCM (fL)	18,34
CHCM (g/dl)	54,65
Leucócitos (células/ μ L)	5.356 \pm 601

4.2.4) EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE *A. multispinis* TRATADOS COM LPS

Nos animais tratados com LPS houve diferença significativa entre o número de leucócitos em relação ao grupo controle (VEIC), mostrando que o LPS incita uma resposta leucocitária em peixes (Figura 8). Igualmente ao LPS, os grupos intoxicados com deltametrina (0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹) também mostraram resposta aumentada em relação ao número de leucócitos, não havendo diferença significativa entre eles. O grupo LPS + DM 0,3 mostrou uma resposta leucocitária muito maior e significativa em relação ao grupo que recebeu somente LPS ou somente DM 0,3 mg.kg⁻¹. Na Tabela 2 observamos as médias e erros padrão da média do número de leucócitos/ μ L de sangue dos grupos tratados. Observamos que a DM na menor dose produziu uma potenciação ao efeito do LPS e, no entanto a maior dose DM produziu um efeito de adição ao LPS, pois aumentou aproximadamente duas vezes o número de leucócitos no sangue.

Tabela 2: Valores médios e erros padrão da média do número de leucócitos/ μL de sangue de *A. multispinis* expostos ou não a deltametrina (0,1 e 0,3 mg.kg^{-1}) e estimulados ou não com LPS (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) (n=10).

Grupos	Leucócitos/ μL
Veículo	5.356 ± 601
DM0,1	12.920 ± 1.554
DM0,3	10.490 ± 1.302
LPS	16.230 ± 1.170
LPS + DM0,1	18.440 ± 1.371
LPS + DM0,3	31.280 ± 1.307

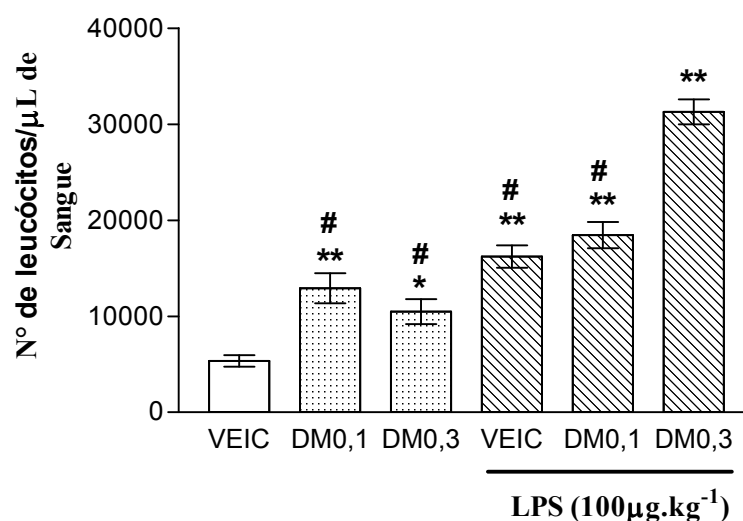


Figura 8: Efeito da deltametrina (DM) sobre o número de leucócitos sangüíneos em *A. multispinis* tratados ou não por LPS. Os animais receberam DM nas doses de 0,1 e 0,3 mg. kg^{-1} (i.p.), 96 horas antes da injeção de LPS (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, i.p.) ou tween 80 + salina (VEIC, i.p.). As barras indicam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de de leucócitos/ μL de sangue de dez animais. * $p < 0.05$ em relação ao grupo VEIC; ** $p < 0,001$ em relação ao grupo VEIC; # $p < 0,001$ em relação ao grupo LPS + DM 0,3.

O número de eritrócitos dos dois grupos de peixes expostos a maior dose de deltametrina, tratados ou não com LPS, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (VEIC), mostrando uma elevação de 78 e 165 %, respectivamente (Figura 9). A estimulação de eritrócitos do sangue dos peixes do grupo LPS + DM 0,3 foi muito maior e significativamente diferente quando comparamos aos peixes que receberam somente LPS, pois houve um aumento de 78%, ou somente foram expostos a DM 0,3 mg.kg⁻¹, com um aumento em torno de 48% . Na Tabela 3 podemos observar as médias e erros padrão da média do número de eritrócitos/μL de sangue dos grupos experimentais.

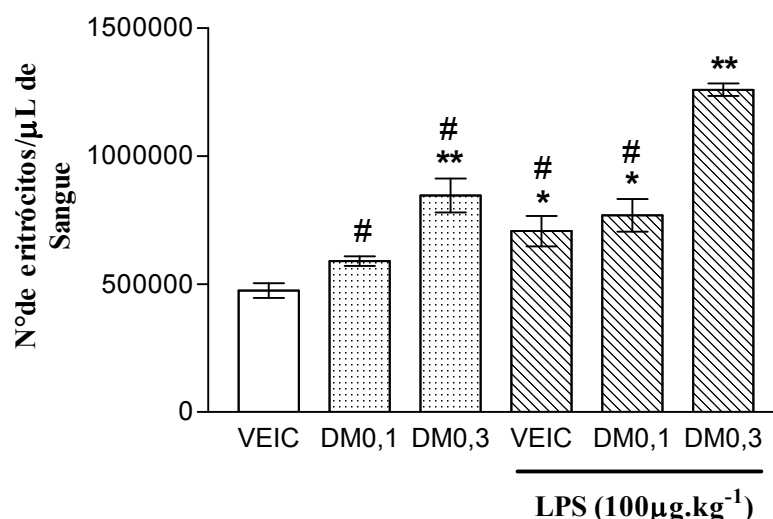


Figura 9: Efeito da deltametrina (DM) sobre o número de eritrócitos sangüíneos em *A. multispinis* tratados ou não por LPS. Os animais receberam DM nas doses de 0,1 e 0,3 mg. kg⁻¹ (i.p.), 96 horas antes da injeção de LPS (100 μg.kg⁻¹, i.p.) ou tween 80 + salina (VEIC, i.p.). As barras indicam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) do número de eritrócitos/μL de sangue de dez animais. * p < 0,01, ** p < 0,001 em relação ao grupo VEIC; # p < 0,001 em relação ao grupo LPS + DM0,3.

Tabela 3: Valores médios e erros padrão da média do número de eritrócitos/ μL de sangue de *A. multispinis* expostos ou não a deltametrina (0,1 e 0,3 mg.kg^{-1}) e estimulados ou não com LPS (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) (n=10).

Grupos	Eritrócitos/ μL
Controle	474.500 \pm 28.540
DM0,1	589.300 \pm 18.660
DM0,3	845.800 \pm 65.980
LPS	706.500 \pm 59.430
LPS + DM0,1	767.600 \pm 63.740
LPS + DM0,3	1.259.000 \pm 24.650

Na Figura 10, observamos um aumento significativo nos valores das taxas da hemoglobina dos peixes expostos a DM 0,3 mg.kg^{-1} em relação aos grupos controle (VEIC), DM 0,1 mg.kg^{-1} e LPS (VEIC). No entanto, a DM associada com o LPS não apresentou alteração sobre as taxas da hemoglobina. O grupo de peixes que foi estimulado com LPS não apresentou alteração na taxa da hemoglobina quando comparado com o grupo controle (VEIC). Na Tabela 4 podemos observar as médias e erros padrão da média dos valores da hemoglobina (g/dL) de sangue dos grupos experimentais.

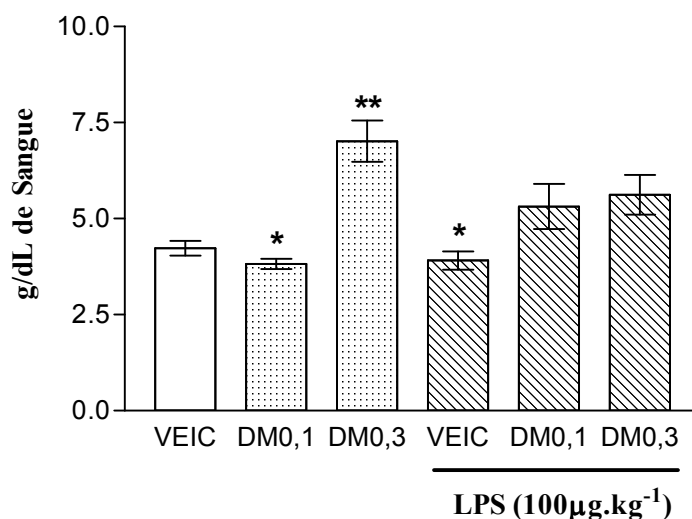


Figura 10: Efeito da deltametrina (DM) sobre a taxa de hemoglobina em *A. multispinis* tratados ou não por LPS. Os animais receberam DM nas doses de 0,1 e 0,3 mg.kg^{-1} (i.p.), 96 horas antes da injeção de LPS (100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, i.p.) ou tween 80 + salina (VEIC, i.p.). As barras indicam a média \pm erro padrão da média

(e.p.m.) da taxa da hemoglobina (g/dL) de sangue de dez animais. ** $p < 0,001$ em relação ao grupo VEIC; * $p < 0,001$ em relação ao grupo DM 0,3.

Tabela 4: Valores médios e erros padrão da média da taxa de hemoglobina (g/dL) do sangue de *A. multispinis* expostos ou não a deltametrina (0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹) e estimulados ou não com LPS (100 µg.kg⁻¹) (n=10).

Grupos	Hemoglobina (g/dL)
Controle	4,22 ± 0,18
DM0,1	3,82 ± 0,13
DM0,3	7,01 ± 0,53
LPS	3,91 ± 0,23
LPS + DM0,1	5,31 ± 0,58
LPS + DM0,3	5,62 ± 0,51

Os valores do hematócrito encontrados não mostraram diferença significativa entre os grupos analisados, como podemos verificar na Figura 11. Na Tabela 5 podemos observar as médias e erros padrão da média dos valores do hematócrito (%) de sangue dos grupos experimentais.

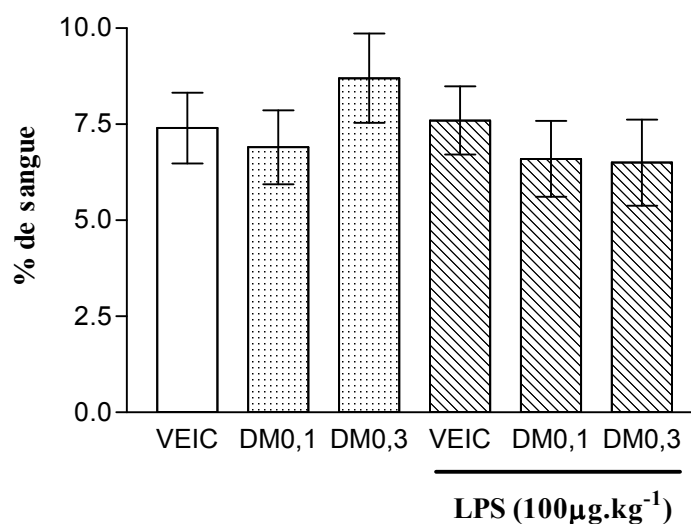


Figura 11: Efeito da deltametrina (DM) sobre a taxa de hematócrito em *A. multispinis* tratados ou não por LPS. Os animais receberam DM nas doses de 0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹ (i.p.), 96 horas antes da injeção de LPS (100 µg.kg⁻¹, i.p.) ou tween 80 + salina (VEIC, i.p.). As barras indicam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) dos valores da taxa de hematócrito (%) do sangue de dez animais. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 5: Valores médios e erros padrão da média da taxa de hematócrito (%) do sangue de *A. multispinis* expostos ou não a deltametrina (0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹) e estimulados ou não com LPS (100 µg.kg⁻¹) (n=10).

Grupos	Taxa de Hematócrito (%)
Controle	7,4 ± 0,92
DM0,1	6,9 ± 0,95
DM0,3	8,7 ± 1,16
LPS	7,6 ± 0,88
LPS + DM0,1	6,6 ± 0,99
LPS + DM0,3	6,5 ± 1,11

A contagem diferencial das células sangüíneas de *A. multispinis* apresentou 12% de trombócitos, 30% de linfócitos, 35% de monócitos e 23% de granulócitos (grupo controle), não havendo diferença significativa entre os grupos estimulados com LPS ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e / ou expostos a deltametrina ($0,1$ e $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$). Porém houve muita dificuldade em identificar com precisão as células sangüíneas seguindo a metodologia proposta.

4.2.5) EFEITO DA DELTAMETRINA SOBRE OS PARÂMETROS DO EXSUDATO PERITONEAL DE *A. multispinis* TRATADOS COM LPS

Para a avaliação do exsudato peritoneal foi realizada a contagem total de leucócitos. De acordo com o resultado do grupo controle mostrado na Figura 12, podemos observar que a cavidade peritoneal de *A. multispinis* possui uma população natural de leucócitos residentes de $530 \pm 30,8$ leucócitos/ μL de exsudato peritoneal. A administração de LPS ($0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, i.p.) induziu migração leucocitária, elevando o valor de leucócitos significativamente (1.381 ± 116 leucócitos/ μL de exsudato peritoneal) em relação ao grupo controle (Figura 12). A DM nas duas doses administradas, $0,1$ e $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ também provocaram o mesmo tipo de resposta se comparada com o LPS em relação ao grupo controle. Valores similares de 1.367 ± 112 leucócitos/ μL de exsudato peritoneal foram encontrados no grupo LPS + DM $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$, mostrando que a DM nesta dose não apresenta efeito sinérgico com o LPS. No entanto, a deltametrina na maior dose ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) associado com LPS apresentou uma estimulação duas vezes maior no número de leucócitos em relação ao grupo somente estimulado com LPS ou somente exposto a DM $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$, mostrando que a DM $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ apresenta um efeito aditivo ao LPS. As médias e erros padrão da média do número de leucócitos/ μL de exsudato peritoneal dos grupos experimentados estão representados na Tabela 6.

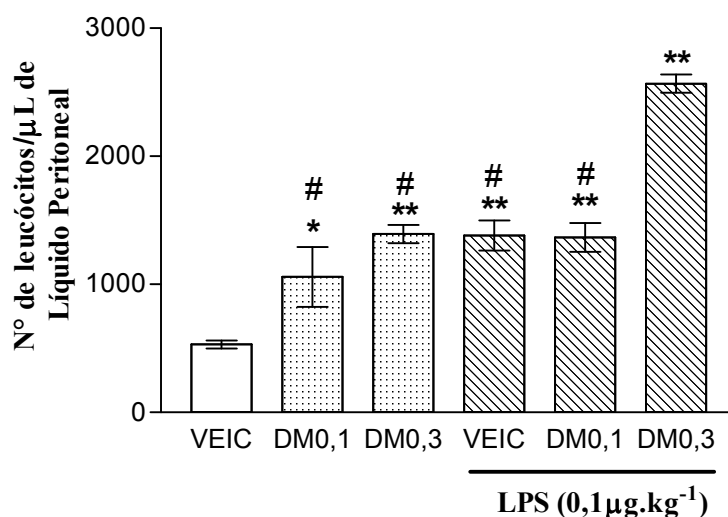


Figura 12: Efeito da deltametrina (DM) sobre o número de leucócitos peritoneais em *A. multispinis* tratados ou não por LPS. Os animais receberam DM nas doses de 0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹ (i.p.), 96 horas antes da injeção de LPS (0,1 µg.kg⁻¹, i.p.) ou tween 80 + salina (VEIC, i.p.). As barras indicam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) do número de leucócitos/µL de exsudato peritoneal de dez animais. * p < 0,05; ** p < 0,001 em relação ao grupo VEIC; # p < 0,001 em relação ao grupo LPS + DM0,3.

Tabela 6: Valores médios e erros padrão da média do número de leucócitos/µL de exsudato peritoneal de *A. multispinis* estimulados ou não com LPS (0,1 µg.kg⁻¹) e expostos ou não a deltametrina (0,1 e 0,3 mg.kg⁻¹) (n=10).

Grupos	Leucócitos/µL
Controle	530 ± 30
DM0,1	1.000 ± 222
DM0,3	1.393 ± 71
LPS	1.381 ± 116
LPS + DM0,1	1.367 ± 112
LPS + DM0,3	2.567 ± 714

4.3) CULTIVO CELULAR EM *A. multispinis*

Com a estimulação de macrófagos de *A. multispinis* “*in vitro*” obtivemos como resultado a produção de óxido nítrico, como pode ser observado a seguir:

4.3.1) DETERMINAÇÃO DA DOSE DE LPS PARA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM *A. multispinis*

De acordo com produção de óxido nítrico, mostrada na Figura 13 podemos observar que as duas concentrações de LPS utilizadas estimularam significativamente os macrófagos de *A. multispinis*. Mas também observamos uma diferença significativa entre as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS sobre a produção de NO_2 pelos macrófagos do rim de *A. multispinis*, sendo que a dose maior provocou uma resposta maior. Assim, a dose de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi utilizada para todos os experimentos de cultivo celular.

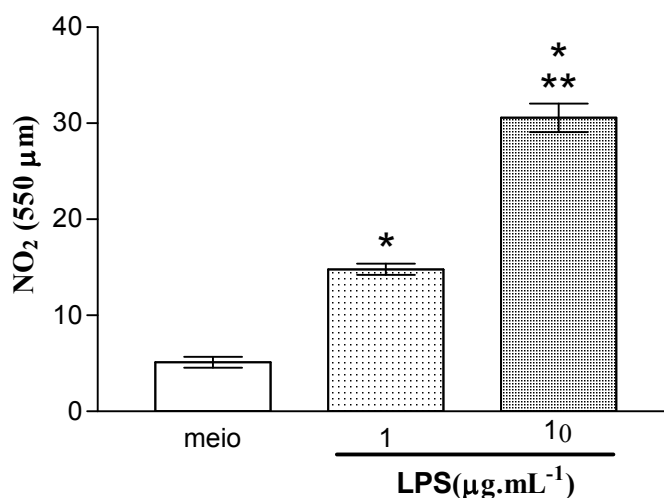


Figura 13: Efeito do LPS sobre a liberação de nitrito por macrófagos. Macrófagos do rim de *A. multispinis* foram incubados com LPS (1 ou 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou meio durante 48 horas. O sobrenadante foi recolhido após 48 horas e os níveis de nitrito avaliados por Griess. As barras indicam a média \pm e.p.m. da concentração de nitrito em nm para valores em sextuplicata (pool de 8 animais). * $p < 0,001$ em relação ao meio; ** $p < 0,001$ em relação ao grupo LPS 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.2) EFEITO DA DEXAMETASONA E DO LPS SOBRE A PRODUÇÃO DE NO₂ POR MACRÓFAGOS DO RIM DE *A. multispinis*

A dexametasona ($0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu significativamente a produção de NO₂ por macrófagos em relação às células não tratadas, porém a viabilidade celular não foi alterada, pois verificamos pela técnica de extrusão de corante que 75 % das células estavam viáveis no momento da análise do NO. Com relação a estimulação com LPS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), confirmamos novamente a estimulação significativa dos macrófagos em relação ao meio. Quando adicionamos dexametasona ao LPS, a estimulação dos macrófagos foi significativamente menor, sendo que à medida que aumentamos a dose de dexametasona, a estimulação diminuiu, mostrando que a dexametasona inibe a ação do LPS (Figura 14).

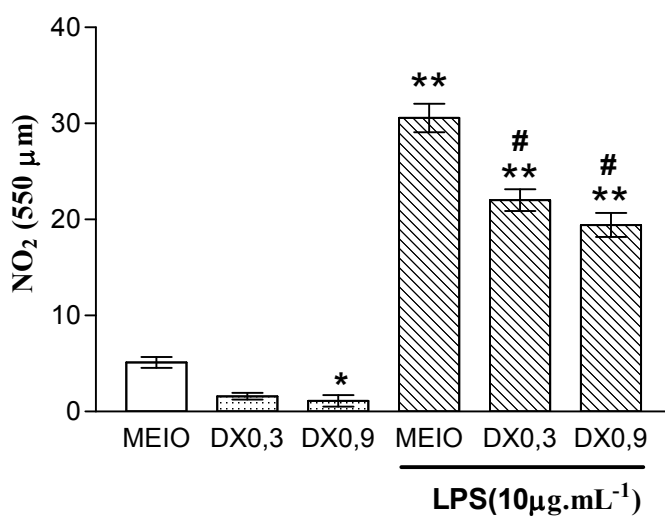


Figura 14: Efeito da dexametasona (dexa) sobre a liberação de nitrito por macrófagos estimulados ou não com LPS. Macrófagos do rim de *A. multispinis* foram incubados com LPS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou meio na presença ou ausência de dexametasona (DX0,3 e DX0,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 48 horas. O sobrenadante foi recolhido após 48 horas e os níveis de nitrito avaliados por Griess. As barras indicam a média \pm e.p.m. da concentração de nitrito em nm para valores em sextuplicata (pool de 8 animais). * $p < 0,05$ em relação ao meio; ** $p < 0,001$ em relação ao meio e aos grupos DX0,3 e DX0,9; # $p < 0,001$ em relação ao LPS $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.3) EFEITO DA DELTAMETRINA E DO LPS SOBRE O CULTIVO DE MACRÓFAGOS EM *A. multispinis*

A resposta dos macrófagos do rim de *A. multispinis* foi significativamente maior, aproximadamente três vezes mais, quando estes foram estimulados com DM ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e duas vezes mais com os outros grupos experimentais em relação ao meio (Figura 15). No entanto, quando comparamos os grupos tratados somente com deltametrina ($0,3$ e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou deltametrina na menor dose associada com LPS não houve diferença significativa com o grupo estimulado só com LPS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mostrando que a DM provoca a mesma intensidade de resposta que o LPS. Entre os grupos tratados houve diferença significativa do grupo LPS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com deltametrina na maior dose ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em relação aos outros grupos tratados, mostrando que esta dose de DM potencializa a resposta do LPS pelos macrófagos.

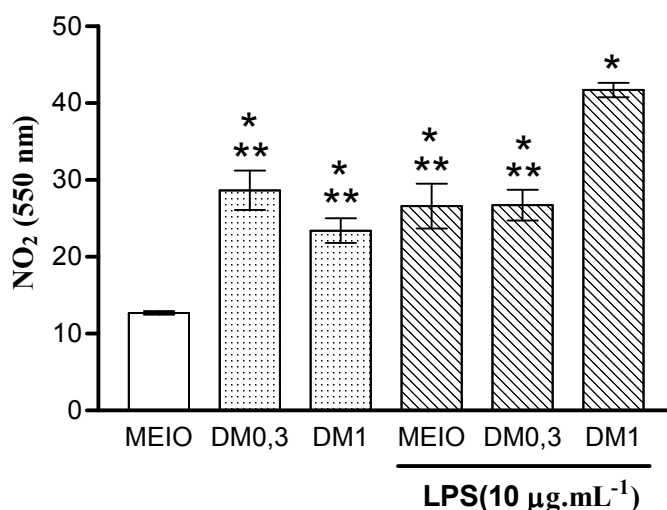


Figura 15: Efeito da deltametrina (DM) sobre a produção de nitrito em macrófagos estimulados ou não com LPS. Macrófagos do rim de *A. multispinis* foram incubados ou não com LPS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou meio na presença ou não de deltametrina ($0,3$ e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 48 horas. O sobrenadante foi recolhido após 48 horas e os níveis de nitrito avaliados por Griess. As barras indicam a média \pm e.p.m. da concentração de nitrito em nm para valores em sextuplicata (pool de 8 animais). * $p < 0,001$ em relação ao meio; ** $p < 0,001$ em relação ao grupo LPS + DM ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.3.4) VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS DE *A. multispinis*

A viabilidade celular foi realizada pela técnica de extrusão de corante no momento da incubação com LPS ou deltametrina, e também em 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a incubação, sendo que no momento da leitura (48 horas após a estimulação) haviam aproximadamente 80 % de células viáveis (Tabela 7). No entanto, 1 e 2 horas após a incubação com LPS ou deltametrina não pode ser realizada a contagem, porque as células estavam aderindo-se à superfície, portanto tornaram-se disformes dificultando a contagem, porém viáveis. Não houve diferença significativa entre a verificação da viabilidade com LPS em relação a deltametrina.

A viabilidade celular foi avaliada também pelo método do MTT. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados, porém as células estavam viáveis no momento da análise (Figura 16).

Tabela 7: Viabilidade celular da estimulação de macrófagos de *A. multispinis* por Deltametrina e LPS

Tempo de Verificação	% de viabilidade
Momento da estimulação	100
1 hora após a estimulação	Células viáveis
2 horas após a estimulação	Células viáveis
4 horas após a estimulação	91
6 horas após a estimulação	88
24 horas após a estimulação	82
48 horas após a estimulação	78

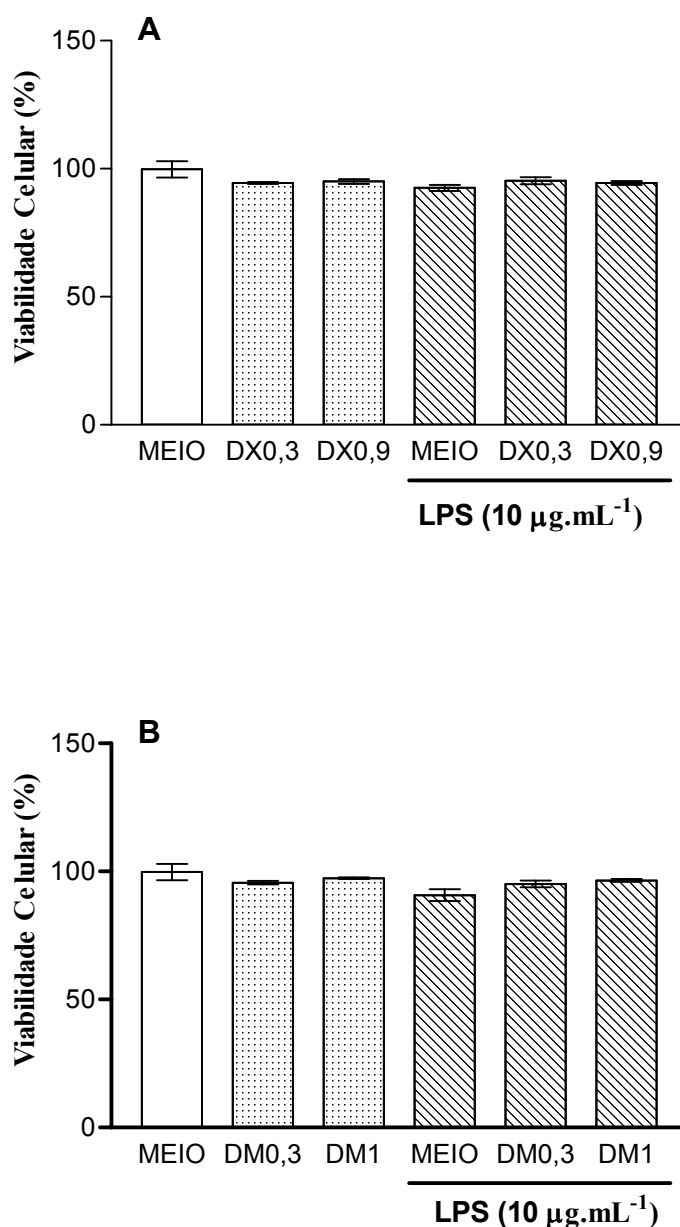


Figura 16: Avaliação da viabilidade celular de macrófagos de rim de *A. multispinis* tratados com dexametasona (0,3 e 0,9 µg.mL⁻¹) - painel A e deltametrina (0,3 e 1 µg.mL⁻¹) - painel B durante 48 horas. Macrófagos do rim de *A. multispinis* foram incubados ou não com LPS (10 µg.mL⁻¹) ou meio. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. As barras indicam a média ± e.p.m. da concentração de nitrito em nm para valores em sextuplicata (pool de 8 animais). 100% de viabilidade correspondem à viabilidade celular determinada para as células cultivadas apenas em meio de cultura. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5) DISCUSSÃO

5.1) AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA EM *A. multispinis*

Neste estudo foi observado um aumento na atividade da colinesterase em *A. multispinis*, causado pela deltametrina, resultado também encontrado por AKAISHI (2003) avaliando músculo de *Fundulus heteroclitus* coletados em áreas de esgotos não tratados e de atividade agrícola. Sabe-se que os piretróides não são inibidores específicos da colinesterase, mas REDDY & PHILLIP (1994) relataram uma inibição da colinesterase em brânquias, músculos e fígados de carpas expostas a piretróides. Em carpas expostas a deltametrina observou-se uma inibição da colinesterase no plasma de 20% (SZEGLITES et al., 1995). Em contraste, foi descrito ativação da colinesterase em músculo de trutas expostas a 0,9% de cipermetrina (DAVIES & COOK, 1993) e em *Puntius conchoni* expostos a endossulfano (GILL et al., 1990).

Resultados em cascudos (*A. multispinis*) expostos ao endossulfano e deltametrina de KLEMZ (2002) e NICARETTA (2003), respectivamente, não mostraram alterações na atividade colinesterásica. THUVANDER et al. (2002), estudando trutas arco-íris expostas a Clophen A50 (PCBs), também não observaram alterações da acetilcolinesterase no músculo e cérebro.

Segundo um estudo em carpas, a deltametrina reduziu a atividade da colinesterase no músculo (BÁLINT et al., 1995). GHORPADE et al. (2002) relataram redução da colinesterase em cérebro e músculo de *Civihina mregala* expostos a Dietil Ftalato, via hídrica. SEVGILER et al. (2004) e FERNANDEZ-VEGA et al. (2002) relataram redução da colinesterase em *O. niloticus* e *A. anguilla* expostos a etoxazole e carbamato, via hídrica, respectivamente. Em adição a estes agentes, o mercúrio tem também mostrado ser causa de inibição (GUILHERMINO et al., 1996; MELA, 2004).

TORTELLI (2005) encontrou resultados semelhantes aos deste estudo, porém analisando a atividade colinesterásica em cérebro de bagres (*Cathorops spixii*) coletados na natureza, sugerindo que pode haver diferenças entre animais em contato com contaminantes, pois alguns peixes podem adaptar-se aos inúmeros contaminantes encontrados no meio aquático, e também que a atividade da colinesterase pode ser afetada por respostas de estresse e mediada pela liberação de adrenalina.

É sugestivo que a atividade enzimática da ChE seja dependente do tipo de inseticida, das diferentes espécies de peixe e do tipo de tecido analisado.

As principais reações metabólicas descritas para o metabolismo da deltametrina são oxidações mediadas pelo sistema de monoxigenase microsomal em mamíferos. Sendo que as vias de degradação de piretróides em bovinos, aves e peixes são semelhantes aos roedores (CASIDA et al., 1983; KULKARNI & HODGSON, 1984; SHONO et al., 1979). Porém, comparações de estudos metabólicos *in vivo* e *in vitro* mostraram que os peixes têm baixa capacidade para metabolizar e eliminar inseticidas piretróides (GLICKMAN et al., 1981; GLICKMAN et al., 1982).

Neste estudo não foi observada diferença significativa na atividade catalítica da EROD entre os grupos analisados. MITCHELMORE et al. (1996) não encontraram nenhuma alteração na atividade da EROD no fígado de turbot expostos a compostos nitroaromáticos (nitropirene e nitrofurantoína) injetados intraperitonealmente. Contudo, NICARETTA (2003) mostrou que a deltametrina (i.p.) em outras doses induziu a atividade da EROD em *A. multispinis*, mesmo não sendo específico para este poluente. Aumento na atividade da EROD em larvas de peixes expostos a bifenilas e a hidrocarbonetos aromáticos, foi relatado por BINDER & STEGEMAN (1980), PETERS et al. (1994) e GOKSOYR & FORLIN (1992).

Vários fatores influenciam o citocromo P450 de peixes e a sua conseqüente determinação, como diferentes tratamentos da amostra (nível de estresse, preparação do tecido, conservação da amostra) e a execução do ensaio (BUCHELI & FENT, 1995).

A atividade catalítica determinada com substratos específicos tem sido extensamente utilizada como marcador da exposição ambiental e para indicar regulação diferencial de formas distintas de CYP450 que é determinada pela atividade da EROD (etoxiresorufina-*O*-deetilase). No entanto, a atividade da EROD em *A. multispinis* expostos a deltametrina não mostrou alteração quando comparados com o grupo controle.

A enzima GST desempenha um importante papel na conjugação e eliminação de compostos eletrofílicos (inseticidas). Assim animais que habitam ambientes poluídos podem estar expostos á xenobióticos, que sofrem desintoxicação mediada pela glutatona e catalisada pela GST, reduzindo a sua quantidade no organismo (HABIG et al., 1974). A atividade de GST pode estar aumentada como resultado da biossíntese de novas isoformas de GST em vários organismos após contato

com xenobióticos, os quais sofrem desintoxicação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima glutathione *S*-transferase.

Uma simples dose de BNF (β -naftaflavona) induz a atividade da GST em trutas, no entanto um segundo tratamento três dias após a primeira exposição diminuiu a atividade (ZHANG et al., 1990). EGAAS et al. (1999) mostraram que o propiconazole induziu a atividade da GST hepática em trutas (*S. trutta*). JONSSON et al. (2002) mostraram que o paclobutrazol induziu atividade da GST no fígado, mas não havendo alteração no tecido muscular.

Alguns estudos que analisaram GST utilizando amostras de fígado de peixes expostos a BNF, Clophen A50 e paclobutrazol, mostraram indução da enzima (ANDERSSON et al., 1985; JONSSON et al., 2002). Porém RONDON-VON OSTEN et al. (2005) relataram que em brânquias de mosquitofish expostos a carbofurano houve inibição (40%) da atividade da GST.

Neste estudo houve redução na atividade da GST em brânquias de *A. multispinis* intoxicados com deltametrina. Segundo SCOTT et al. (1992), linguados expostos a 3-MC (3-metilcolantreno) tiveram a glutathione *S*-transferase hepática reduzida sugerindo inibição do metabolismo, acredita-se que muitas variações entre populações de peixes nativos e entre a relação dose / resposta pode ser encontrada. Talvez a biotransformação da deltametrina em compostos mais facilmente eliminados não envolva reações de conjugação. Portanto para se conhecer melhor a via de eliminação dos piretróides, há necessidade de avaliar outros tecidos e outros substratos, pois pode tratar-se de outra isoforma da GST.

5.2) MIGRAÇÃO E CULTIVO CELULAR EM *A. multispinis*

Embora as condições do sangue de peixes venham sendo cada vez mais utilizadas em programas de biomonitoramento como indicadores de alterações fisiológicas, segundo BOLS et al. (2001) e AFFONSO et al. (2002), o problema mais importante para o uso desses dados em estudos ambientais é a falta de informação básica sobre a resposta do sangue contra agentes exógenos e principalmente em espécies tropicais.

A contagem de eritrócitos, a taxa de hemoglobina no sangue total, a taxa de hematócrito, o volume corpuscular médio, a quantidade de hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média são alguns dos parâmetros hematológicos comumente utilizados em peixes (HEATH, 1995). CERQUEIRA & FERNANDES (2002) avaliaram por meio dos parâmetros acima descritos a exposição de *Prochilodus scrofa* ao CuSO₄.

Além da temperatura, outros fatores são apontados como responsáveis por variações do quadro sanguíneos em peixes teleósteos, pois DENTON & YOUSEF (1975) observaram variações sazonais no hematócrito e na concentração de hemoglobina em *O. mykiss*, cultivados durante um ciclo anual e em temperatura constante (11 – 13°C). Atribuíram tais alterações à dieta e às atividades metabólicas da espécie.

A época da colheita das amostras de sangue de *A. multispinis* interferiu com os resultados obtidos. A melhor época para a colheita coincidiu com a época de sua reprodução (entre os meses de setembro e fevereiro). O sangue do *A. multispinis* possui a capacidade de hemolisar facilmente, característica também observada por HRUBEC et al. (1996) em diversas espécies de peixes. Problemas como estes foram descritos por outros autores. No sangue circulante de *Coregonus macrophthalmus* eritrócitos imaturos foram observados durante todo ano, mas sua frequência é maior no outono (CAVICCHIOLLI & ZAVARINI, 1977). Similarmente, *Colossoma macropomum* na Amazônia brasileira, exibiu significativa alteração sazonal no hematócrito relacionada ao nível de oxigênio dissolvido, sendo os maiores valores encontrados no mês de março (VAL, 1999).

Os peixes apresentam os mesmos tipos celulares do sangue periférico do que outros vertebrados, possuindo a mesma morfologia e a mesma função fisiológica do que os encontrados em mamíferos. Porém existem vários fatores que limitam a interpretação dos resultados. O fator biológico mais importante na interpretação das análises das células brancas é a variação em tipo, número e aparência dos leucócitos nas diferentes espécies de peixes (BARTON & IWAMA, 1991).

O número de leucócitos do sangue encontrado no *A. multispinis* (4143 – 5797 cel/ μ L) é menor do que o de outras espécies, tais como: tilapia (21600 – 154700 cel/ μ L), *Chanos chanos* (milkfish) (17500 – 92500 cel/ μ L), *I. punctatus* (bagre do canal) (164000 cel/ μ L), *Colossomus brachypomum* (tambaqui) (33500 cel/ μ L) e *Oncorhynchus aquabonita* (truta) (61900 – 62900 cel/ μ L) (HRUBEC et al., 1996). No

bagre tropical *Clarias lazera* ocorre aumento de leucócitos totais no período de verão, quando é maior a temperatura e o período de luz nas regiões tropicais (SHABANA et al., 1990).

O número de eritrócitos encontrado para o *A. multispinis* é muito menor do que em outras espécies estudadas, mas temos que salientar que esta espécie tem comportamento noturno, vive em profundidade e é pouco ativo, portanto o consumo de oxigênio pode ser menor do que as espécies que costumam ser estudadas, tais como: trutas, salmolídeos, carpas e tilápias (LANE, 1979; IWAMA et al., 1986; SPECKNER et al., 1989; HRUBEC et al., 2000, respectivamente). Segundo HRUBEC et al. (1996) o número de eritrócitos varia de acordo com a necessidade de oxigênio.

Os teleósteos de respiração aérea possuem taxa metabólica elevada devido ao curto tempo de circulação sanguínea. Assim, apresentam menor quantidade de eritrócitos e hematócrito (PÉREZ et al., 1984), mas tem maior volume nos eritrócitos que os peixes de respiração exclusivamente aquática e de hábito lento (ALMEIDA – VAL & VAL, 1995). Essa relação é clara nos cascudos, peixes de respiração aérea facultativa quando comparados às espécies das famílias Characidae, Cichlidae, Centrarchidae, Mugilidae, Salmonidae e Anostomidae, de respiração exclusivamente aquática. O cascudo *Hypostomus regani* é uma espécie que além de ter respiração aérea facultativa vive em águas correntes e rasas bem oxigenadas e utiliza o estômago como órgão acessório para respiração aérea (FERNANDEZ et al., 1999). Assim esse peixe não necessita de muitos eritrócitos para carrear hemoglobina. Resultado semelhante foi encontrado com a espécie de cascudo estudada.

Estudos recentes demonstraram que há uma relação inversa entre o tamanho dos eritrócitos e a habilidade natatória de teleósteos marinhos, com reflexo na concentração de hemoglobina. Nesses peixes é alta a demanda de oxigênio e elevada a taxa metabólica. A eficiente capacidade de locomoção é sustentada por grande massa de músculo vermelho aeróbico. Entretanto, as espécies mais sedentárias possuem menor quantidade de eritrócitos, menor concentração de hemoglobina corpuscular média e maior volume de eritrócitos, uma vez que possuem pouco músculo vermelho exaurindo-se rapidamente durante o esforço físico. Em teleósteos dulcícolas, as espécies de menor porte, geralmente, possuem menor quantidade de eritrócitos que as maiores. No entanto, as espécies menores têm hábitos relativamente ativos sendo sua demanda de oxigênio compatível com sua quantidade de eritrócitos (TAVARES DIAS & MORAES, 2004).

Os valores da hemoglobina ($4,22 \pm 0,18$ g/dL) dos cascudos também foram mais baixos do que os encontrados na literatura. Segundo HRUBEC et al. (1996), os valores da hemoglobina são baixos quando comparados com mamíferos, geralmente entre 5 e 10 g/dL, no entanto, peixes mais ativos podem ter valores mais altos. Índices de hemoglobina e eritrócitos tem sido determinado em vários estudos, mas não tem resultados conclusivos que possam ser relacionados com problemas de anemias.

Os valores da taxa de hematócrito do *A. multispinis* foram mais baixo quando comparado com outras espécies tropicais. Valores da taxa do hematócrito observados em sangue de *H. malabaricus* foi de 25,33% (COSTA, 2006), em *I. punctatus* foi 23,9% (LIM et al., 2000) e em *C. macropomum*, entre 20–23% (AFFONSO et al., 2002), mas são distintos daqueles de outras espécies como *O. mykiss* (35,6%; MATTSSON et al., 2001) e *Rhandia quelen* (35,3%; LERMEN et al., 2004).

Relatos de HRUBEC et al. (1996), mostram os valores hematológicos extremamente mais elevados do que encontramos para a espécie estudada, mas devemos salientar que as espécies estudadas pelos referidos autores são coletadas em ambientes diferentes e também mais ativas. Outros fatores como: estado nutricional, sazonalidade, maturação gonadal, sexo e variação genética também podem influenciar significativamente as variáveis hematológicas (KORI-SIAKPERE, 1976), fatores estes também observados neste estudo. Contudo pode haver ainda, diferenças na metodologia de colheita de sangue, como tipo de anticoagulante, as quais também podem atuar como fonte de variação de resultados hematológicos em peixes. TAVARES-DIAS & SANDRIN (1998) demonstraram que o hematócrito e taxa de hemoglobina do sangue heparinizado são maiores se comparados ao encontrado no sangue colhido com EDTA, para um mesmo animal.

Após estresse pode haver alterações no hemograma dos peixes. As alterações na concentração de hemoglobina, hematócrito ou contagem de eritrócitos, indicam a ocorrência de hemoconcentração (aumento desses parâmetros) ou hemodiluição (redução hemoconcentração), devido à disfunção osmorregulatória. Além disso, a hemoconcentração pode ser decorrente do aumento do consumo de oxigênio, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética e/ou de liberação de eritrócitos pelo baço. Entre as alterações leucocitárias, a mais comum é a redução do percentual ou número de linfócitos circulantes, possivelmente em decorrência de sua redistribuição entre os órgãos linfopoiéticos ou do tráfego desses leucócitos (TAVARES & MORAES, 2004). Em *Stizostedion vitreum* 60 minutos após

manipulação ocorreu aumento no número de linfócitos, que diminuíram após 180 minutos, sem alteração no percentual de neutrófilos (BARTON & ZITZOW, 1995). A captura de *P. mesopotamicus* (MARTINS et al., 2000) aumenta o percentual de neutrófilos e reduz o de linfócitos, enquanto em *C. macropomum* causa leucocitose, decorrente do aumento do número de linfócitos e de neutrófilos (TAVARES-DIAS et al., 2000a). Por outro lado, em *I. punctatus* ocorre leucopenia, linfocitopenia e neutrofilia após o transporte (ELLSAESSER & CLEM, 1986).

Neste estudo, na contagem diferencial de leucócitos no sangue, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Foi encontrada muita dificuldade para caracterizar as células na contagem diferencial e, segundo AFONSO et al. (1998) e VALE et al. (2002), é difícil distinguir e quantificar a população leucocitária (monócitos e neutrófilos) usando critérios simples de morfologia. O ideal seria usar técnicas citoquímicas, incluindo análise de peroxidase, seguida por periódicas reações de ácido – Schiff.

Fagocitose, morte e degradação de microorganismos invasores por fagócitos especializados fazem parte de um processo crucial para a defesa dos vertebrados contra algumas infecções (HINE, 1992; BROWN, 1995). O interessante é que os mamíferos e peixes teleósteos utilizam os mesmos tipos de células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) na defesa de uma infecção (BROWN, 1995). Neutrófilos são encontrados em números altos no sangue e em órgãos hematopoiéticos como uma reserva, mas em condições normais são raros em tecidos e cavidades corporais. Como observado neste estudo, a contagem total de leucócitos do sangue dos *A. multispinis* estimulados com a maior dose de LPS foi significativamente maior quando comparada com o grupo controle. Estes dados sugerem que o LPS pode incitar uma resposta inflamatória, como observado em ratos e em outras espécies de mamíferos (ULICH et al., 1991). Pode ser utilizado em peixes para estudos de inflamação, pois as células sanguíneas de defesa orgânica aumentaram significativamente. A resposta da inflamação aguda caracteriza-se por neutrofilia e monocitose no sangue (ROBERTS, 1989; SUZUKI & IIDA, 1992).

Os peixes respondem de diferentes maneiras de acordo com o estímulo de estresse (CARNEIRO e URBINATI, 1998; MARTINS et al., 2000; 2001; GOMES et al., 2003). Diferente do observado em *B. cephalus* e *C. macropomum* (CARNEIRO e URBINATI, 1998; TAVARES-DIAS et al., 2000a) houve aumento no número de eritrócitos em tilápias submetidas ao estresse contínuo e ao estresse único (MARTINS et al., 2004). MARTINS et al. (2004) relataram inalteração no hematócrito, aumento na

porcentagem de neutrófilos e diminuição de linfócitos em tilápias, resposta similar encontrada nas observações de CARNEIRO e URBINATI (1998), MARTINS et al. (2000, 2003) e TAVARES-DIAS et al. (2000a). O aumento nos números totais de leucócitos e eritrócitos observado em tambacu (MARTINS et al., 2001) difere do estudo com tilápia após o mesmo tipo de estresse (MARTINS et al., 2004). Além disso, foi observado aumento no número de eritrócitos, leucócitos e no hematócrito após o estresse em *C. carpio* (SOPINSKA, 1984); *I. punctatus* (ELSAESSER & CLEM, 1986); em *C. auratus* (HOUSTON et al., 1996) e *Morone saxatilis* (YOUNG & CECHE, 1993). Aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição na de linfócitos são características comumente observadas após o estresse em *S. trutta* (PICKERING, 1984), *A. anguilla* (JOHANSSON-SJÖBECK & LARSSON, 1979) e *B. cephalus* (CARNEIRO et al., 2002).

Quando os peixes foram estimulados com deltametrina observou-se uma leucocitose mostrando que o referido inseticida pode gerar uma resposta inflamatória como o LPS ou uma resposta de estresse, pois segundo vários autores este tipo de resposta pode ser considerado uma resposta de estresse. E diferentemente de outros inseticidas como organofosforados que produziram linfopenia em carpas (SVOBODA et al., 2001), indicando uma diminuição não específica da imunidade. Linfopenia como consequência de intoxicação aguda por paration foi reportado por NATH & BANERJEE (1996) em *H. fossilis*, e também por SIWICKI et al. (1990) em carpas após a intoxicação aguda por triclorfon. Porém, THUVANDER et al. (2002), estudando trutas arco-íris expostas a Clophen A50, não observaram nenhuma diferença significativas sobre os leucócitos.

O número de eritrócitos dos *A. multispinis* que foram expostos a deltametrina aumentaram significativamente, podendo ser explicado devido ao mecanismo de ação da deltametrina (CASIDA et al., 1983) que age prolongando a abertura dos canais de sódio levando à despolarização da membrana podendo inibir a ação do GABA. Estes fatores levam ao estímulo do SNC e à hipóxia, ou seja, anóxia de tecidos periféricos. Resultados semelhantes foram encontrados em relatos com intoxicação aguda por diclorvos em *C. batrachus* (peixe gato) (BENARJI & RAJENDRANATH, 1990), por triclorfon em *Piaractus mesopotamus* (pacu) (TAVARES-DIAS et al., 1999c) e por triclorfon em *Oreochromis mossambicus* (tilápia) (SAMPATH et al., 1993). Segundo RIFKIND et al. (1980) o aumento do número de eritrócitos e do hematócrito vem sendo mostrado em estudos laboratoriais

em diversas espécies quando expostas a hipóxia. Nestas condições, parece que o baço e talvez o fígado podem reativar a eritropoiese para compensar a demanda pelo aumento do transporte de oxigênio para os tecidos periféricos. CHOWDHURY et al. (2004) mencionam também que um acréscimo na hemoglobina e no hematócrito está relacionado com um aumento da capacidade de transporte de O₂, quando ocorrem danos nas trocas gasosas em tecidos, durante hipóxia e exposições crônicas ou agudas a metais em solução (Cd⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Al⁺⁺ e Ni⁺⁺).

Em *O. mykiss* submetidos a hipóxia, a temperatura de 5°C, ocorre o aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas após 24 horas. Contudo em temperatura de 15°C, esse aumento ocorre tardiamente, após 48 horas. Além disso, esse estresse por hipóxia tem reflexos no consumo de alimentos e no mecanismo eritropoiético dos peixes. Assim, a redução dos níveis de oxigênio dissolvido na água pode aumentar temporariamente a proporção de eritrócitos imaturos na circulação dos peixes (HOUSTON & MURAD, 1995). Porém, em cascudo *H. regani* a hipóxia por exposição ao ar aumenta o número de eritrócitos maduros e imaturos, o hematócrito e a concentração de hemoglobina (FAVARETTO et al., 1981). No *Lipossarcus pardalis* a hipóxia ambiental aumenta o hematócrito, a hemoglobina e o CHCM. Esse aumento na concentração de hemoglobina em ambas condições possivelmente favorece o aumento de transporte de oxigênio, uma vez que não há alteração do número de eritrócitos circulantes (VAL et al., 1990). Similarmente, *C. macropomum* submetido a hipóxia experimental apresenta aumento na quantidade de eritrócitos, hemoglobina e CHCM, sugerindo também aumento na capacidade de carregamento de oxigênio. Porém, o aumento do número de eritrócitos na circulação sanguínea pode ser decorrência de contração esplênica causada pela liberação de catecolaminas, induzindo aumento no hematócrito (AFFONSO, 1999). Em contrapartida peixes expostos ao Pb⁺⁺, o Cd⁺⁺, o Hg⁺⁺ apresentaram anemia (HEATH, 1995).

A inoculação intraperitoneal de agentes infecciosos em ratos tem sido extensivamente utilizada como modelo para análises de resposta inflamatória (SILVA et al., 1987; APPELBERG et al., 1991). AFONSO et al. (1997, 1998) realizaram experimentos em peixes da espécie *O. mykiss* (trutas) utilizando técnicas adaptadas semelhantes às utilizadas para ratos e utilizadas neste estudo com *A. multispinis*.

A apoptose ou morte celular programada, é uma estratégia de eliminação das células desnecessárias em favor da sobrevivência do todo o indivíduo, segundo COHEN & DUKE (1992). Neutrófilos aumentam drasticamente em curto espaço de

tempo nos focos infecciosos, por outro lado, trata-se de um leucócito com elevada citotoxicidade, a qual pode afetar o próprio hospedeiro, portanto neste caso a apoptose é importante para que os níveis de neutrófilos desçam para os valores mínimos após a fase de resolução da inflamação. Já, os macrófagos são residentes em todos os locais do organismo do peixe e é uma célula mais pobre em moléculas citotóxicas, sendo estas as duas células que fazem a fagocitose nos peixes (AFONSO, 1999). Os macrófagos são células de duração mais longa, economizam energia e reduzem o risco de citotoxicidade para o hospedeiro da defesa contra infecções. Podem ser isolados facilmente no sangue (monócitos), órgãos linfóides (rins) e cavidade peritoneal de peixes (SECOMBES, 1996).

Segundo MACARTHUR et al. (1985), a rápida mobilização dos polimorfonucleares e dos mononucleares para o local da lesão serve para minimizar a expansão de doenças e iniciar a resposta imune. Para TAKASHIMA & HIBIYA (1995), os neutrófilos ocorrem em baixa porcentagem em peixes relativamente saudáveis, mas aumentam em número com a ocorrência de lesões hepáticas. MELA (2004) sugeriu que as lesões hepáticas causadas pelo MeHg pode ter sido a principal causa para um aumento no número de neutrófilos em *H. malabaricus* expostos ao organometal.

Com relação à população de leucócitos na cavidade peritoneal dos cascudos, foi observado que existe naturalmente uma pequena população de leucócitos. AFONSO et al. (1997) também relataram a existência de uma pequena população natural na cavidade peritoneal de trutas arco-íris. Quando inoculados com LPS, a migração de leucócitos foi evidente e significativa em relação à população de leucócitos naturais, mostrando a ativação da defesa orgânica da espécie estudada. A resposta da inflamação aguda caracteriza-se por neutrofilia e monocitose no local da lesão (ROBERTS, 1989; SUZUKI & IIDA, 1992; AFONSO, 1999).

A resposta inflamatória foi avaliada a partir da contagem total de leucócitos no exsudato da bexiga natatória de peixes por MARTINS (2000) com injeções de carragenina e LPS em *P. mesopotamicus*, por MARTINS et al. (2001) com injeções de NaCl em híbrido tambacu, e por MARTINS et al. (2004) com injeções de carragenina e LPS em *O. niloticus*.

Em *O. niloticus* (MATUSHIMA & MARIANO, 1996) e *P. mesopotamicus* (MARTINS, 2000) injetados com carragenina, a célula predominante no exsudato inflamatório é o trombócito, havendo também macrófagos e mais raramente linfócitos.

Em *Morene saxtilis* a injeção intra peritoneal com *Bacillus cereus* mortos induz ao aparecimento de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Em *O. mykiss* a injeção de ergosan, um ácido derivado de algas marrom, induz acúmulo no exsudato inflamatório de neutrófilos, mas ocasionalmente linfócitos podem ser encontrados (PEDDIE et al., 2002). A injeção de tioglicolato, LPS e *Aeromonas hydrophila*, em *P. mesopotamicus*, também induz acúmulo predominantemente de trombócitos no sítio inflamado, seguido de linfócitos, granulócitos e macrófagos (BOZZO, 2004).

Em *P. mesopotamicus* (MARTINS, 2000) injetados com carragenina e nas tilápias (MARTINS et al., 2004) injetadas com carragenina e LPS, o número total de leucócitos encontrados no exsudato da bexiga natatória foi de 8.000, 24.555 e 32.229 células/uL, respectivamente. Valores estes muito mais elevados do que os encontrados neste estudo quando a cavidade peritoneal foi estimulada com LPS. Porém segundo os autores MARTINS (2000) e MARTINS et al. (2004) não foi possível obter a população de leucócitos normalmente residentes na bexiga natatória, sendo necessário algum tipo de estímulo. MARTINS et al. (2001) estudaram a resposta inflamatória no híbrido tambacu onde após injeção com NaCl a contagem total de leucócitos no exsudato foi maior do que o mesmo tratamento em tilápia (MARTINS et al., 2004). Quando as tilápias e os tambacu foram submetidos aos estímulos de estresse (captura em rede), a injeção de carragenina provocou aumento no número total de leucócitos no exsudato, quando comparado com os valores dos grupos que não foram submetidos aos estímulos de estresse (MARTINS et al., 2001; 2003). LPS e *E. coli* intraperitonealmente injetados em *P. platessa* induziram três vezes mais o número normal de leucócitos como relatado por MACARTHUR et al. (1984).

Os peixes tratados com a deltametrina tiveram uma migração leucocitária significativamente maior dos que os peixes que não foram expostos ao inseticida, mostrando que a deltametrina pode agir como ativador da inflamação. Resultados semelhantes foram encontrados em trutas expostas a doses baixas de cádmio (ZELIKOFF et al., 1995). Segundo NAYAK et al., 2004, carpas expostas a α -permetrina mostraram diminuição da resistência bacteriana quando em contato com *A. hydrophila*, portanto consideraram a α -permetrina como imunossupressor devido principalmente à redução da proteína total, albumina e globulina.

O sistema imune funciona como um sistema vigilante contra invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos ambientais que perturbam a homeostase do organismo, procurando realizar a destruição rápida e eficiente dos mesmos. A resposta

imune não específica de peixe é freqüentemente reportada como uma função da atividade de macrófagos tais como: fagocitose, quimiotaxia e atividade de neutrófilos. Os neutrófilos tornam-se mais aderentes para tecidos com produção de proteínas, que facilitam sua migração de capilares para o local da injúria, sendo que também exibem um aumento na produção de oxigênio durante o processo de explosão respiratória (NAYAK et al., 2004). Marcadores imunológicos podem ser usados como biomarcadores da saúde de uma população devido à sensibilidade do sistema imune do peixe. A atividade dos neutrófilos pode indicar o status da saúde do peixe, podendo correlacionar com a atividade degradadora de neutrófilos e macrófagos, estabelecendo parâmetros após a imunossupressão por pesticidas e bactérias, servindo como um indicador útil do grau de imunossupressão causado por estes agentes (DAS, 1998).

Segundo AFONSO et al. (1997) utilizando microscopia eletrônica, mostraram que os leucócitos estimulados na cavidade peritoneal são macrófagos (33 - 39%), pequenos linfócitos (46 - 53%), granulócitos (1 - 3%), 9 - 13% das células não puderam ser identificadas, trombócitos e eosinófilos foram raros. No entanto, as células não puderam ser identificadas com confiança por microscopia de luz. Resultado este semelhante aos deste estudo, pois não se conseguiu realizar a contagem diferencial por microscopia de luz. Segundo AFONSO et al. (1999) a atividade da peroxidase pode ser usada como método indireto para avaliação quantitativa da resposta de neutrófilos durante a inflamação peritoneal.

Os macrófagos de rim de *A. multispinis* foram escolhidos, pois permitem medir a resposta citotóxica diretamente na cultura celular e pela sua capacidade para manter as funções imunológicas na presença de diferentes agentes químicos (BARILE et al., 1994). Vários fatores são capazes de estimular os macrófagos (citocinas produzidas pelo hospedeiro frente a intermediários inflamatórios produzidos por microorganismos). Os macrófagos de peixes, como os de mamíferos, são susceptíveis à ativação *in vivo* ou *in vitro*, ativando diapedese, aumentando a sua aderência a superfícies plásticas ou de vidro, fagocitando mais e rapidamente desencadeando a explosão respiratória com produção de ânion superóxido e outros radicais de oxigênio e, conseqüentemente, aumentando sua capacidade bactericida e larvicida (SECOMBES & FLETCHER, 1992).

A produção de NO na ativação de macrófagos de várias espécies de peixes, tais como: gulf killfish (*Fundulus grandis*), turbot (*Scophthalmus maximus*), goldfish (*C. auratus* L.) e sea bass (*D. labrax*), vem sendo estudados por ROSZELL & RICE

(1998), TAFALLA & NOVOA (2000), NEUMANN et al. (2000) e SARMENTO et al. (2004), respectivamente, sendo que os primeiros a demonstrar a indução do NO por macrófagos de peixes foram WANG et al. (1995). Resultados e metodologias semelhantes a este estudo foram encontrados por WANG et al. (1995) em goldfish, após 6 horas da estimulação por LPS, por NEUMANN et al. (1995) em goldfish após 72 - 96 horas da estimulação de LPS e por SARMENTO et al. (2004) em sea bass após 48 horas da estimulação de LPS.

A temperatura utilizada para incubação do cultivo de macrófagos de *A. multispinis* foi entre 20 - 22°C, temperatura habitual desta espécie na natureza. A literatura relata, que a temperatura fora da zona de valores a que o peixe está aclimatado (menor ou maior) inibem as funções dos fagócitos, reduzindo a magnitude da explosão respiratória (SECOMBES & FLETCHER, 1992; HARDIE et al., 1994). NEUMANN et al. (1995) relataram que a produção de fator ativador de macrófagos (MAF) foi dependente da temperatura e duração da incubação (72 - 96 horas em 30°C).

A dexametasona na maior dose utilizada reduziu significativamente a produção de NO em *A. multispinis* ($p < 0,001$) em relação ao meio. Porém não houve redução da viabilidade celular, mantendo-se em torno de 76% do número de células viáveis, sendo que esta porcentagem não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, mostrando que os macrófagos de peixes apresentam o mesmo tipo de resposta dos macrófagos de mamíferos frente a dexametasona. Resultados similares foram encontrados por PAGNIELLO et al. (2002) estudando o efeito de corticosteroides sobre a viabilidade e proliferação de macrófagos de truta arco-íris. Os autores relataram que a viabilidade celular não foi alterada pelo cortisol e dexametasona, no entanto houve redução na capacidade da cultura em produzir NO. Portanto, concluíram que a proliferação dos macrófagos de truta arco-íris é regulada pelo cortisol, porém o efeito é modulado possivelmente, através da liberação de citocinas através de estímulos ambientais.

Moléculas biológicas podem ativar os fagócitos dos peixes (salmões e trutas) como o LPS (SECOMBES, 1990; SOLEM et al., 1995). Segundo SECOMBES & FLETCHER (1992), a presença de certos poluentes na água tem efeito supressores sobre a atividade dos fagócitos dos peixes.

O LPS estimulou os macrófagos de *A. multispinis* nas duas doses utilizadas apresentando diferença significativa em relação ao meio, porém a dose 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou o melhor aumento de nitrito, portanto sendo esta dose escolhida para os

experimentos. Estes resultados são similares aos de SARMENTO et al. (2004) em trutas e TAFALLA & NOVOA (2000) em turbot. Contudo, WANG et al. (1995) utilizaram $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS e NEUMANN et al. (1995) utilizaram $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS para estimular macrófagos em goldfish, evidenciando que a dose de LPS depende da espécie de peixe. A produção de óxido nítrico pelos macrófagos é conhecida como uma via de defesa celular contra invasão de patógenos, tais como vírus, bactérias, protozoários, como também de tumores (NATHAN & HIBBS, 1991). TAFALLA & NOVOA (2000), REYNAUD et al. (2003) relataram significativa estimulação dos macrófagos extraídos de rim anterior de turbot (*S. maximus*) e de carpas (*C. carpio* L.) por LPS, respectivamente, observado pelo aumento da produção de NO.

A deltametrina sozinha ou em associação ao LPS produziu uma grande quantidade de nitrito, mostrando ser também um estimulador de macrófagos de *A. multispinis*. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos expostos a PCBs (bifenilas policloradas) que estimularam rapidamente neutrófilos *in vitro* produzindo grandes quantidades de nitrito (BROWN et al., 1998). Segundo DUCHIRON et al. (2002), o lindade aumentou a atividade dos macrófagos das trutas pela ativação do cálcio intracelular. Esta pode ser a via de ativação do NO pela deltametrina em macrófagos de *A. multispinis*, ou seja, ativando o cálcio intracelular, pois o mecanismo de ação da deltametrina conhecido é prolongar a abertura dos canais de sódio provocando despolarização da membrana, conseqüentemente mantendo o cálcio mais tempo no interior da célula, porém isto deve ser investigado posteriormente. Em contra partida, a ativação de macrófagos extraídos do rim anterior de sea bass (*D. labrax*) expostos a HgCl_2 diminuiu, apresentando relação dose / dependente para produção de NO (SARMENTO et al., 2003) e fagócitos de carpa tratados com triclorfon e diclorvos também inibiram a produção de NO (DUNIER et al., 1991).

Contudo a regulação da ativação de macrófagos em peixes parece ser tão complexa como a de mamíferos, pois existe uma diversidade de métodos que podem ser utilizados na produção de NO, como também várias substâncias que podem estimular ou inibir os macrófagos, dependentes da dose, dos tecidos e da espécie de peixes utilizados nos estudos.

6) CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- O *A. multispinis* pode ser utilizado como um modelo para estudos toxicológicos *in vivo* e *in vitro*;
- As atividades da colinesterase e da GST mostraram ser bons biomarcadores para a DM;
- Os valores basais de leucócitos, eritrócitos e taxa de hemoglobina do *A. multispinis* são menores do que a maioria das espécies estudadas;
- O LPS pode ser utilizado em *A. multispinis* para indução de resposta inflamatória;
- A deltametrina é capaz de produzir leucocitose no sangue e migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em *A. multispinis*;
- Há similaridade no mecanismo da produção de óxido nítrico pelos macrófagos de *A. multispinis* e pelos macrófagos de outras espécies animais;
- Há necessidade de mais estudos em relação ao cultivo celular do *A. multispinis* para elucidar o mecanismo de estimulação dos macrófagos frente a deltametrina e ao LPS.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C. T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost; *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotox. Environ. Saf.** v. 58, p. 220-226. 2004.

AFONSO, A. Os fagócitos dos peixes: uma visão filogenética e comparativa. **Rev. Soc. Port. Immunol.** v.2-3, p. 24-65, 1999.

AFONSO, A.; ELLIS, A. E.; SILVA, M.T. The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunol.** v.7, p. 335-348, 1997.

AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A. E.; SILVA, M.T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A light and electron microscopic cytochemical study. **Dis. Aquat. Org.** v. 34, p. 27-37, 1998.

AFONSO, A.; OLIVEIRA, C.; ELLIS, A. E., SILVA, M.T. Peroxidase activity as a measure of neutrophil and populations in inflammatory peritoneal exudates of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Dis.** v. 22, p. 133-142, 1999.

AFFONSO, E.G. **O gás sulfídrico e a respiração de duas espécies de peixe teleósteos *Hoplosternum littorale* e *Collossoma macropomum*: distribuição, tolerância e adaptação.** Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 1999, 107p.

AFFONSO, E. G.; POLEZ, V. L. P.; CORRÊA, C. F.; MAZON, A. F.; ARAUJO, M. R. R.; MORAES, G.; RATIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleosts fish *Collossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.** C 133, p. 375-382. 2002.

AKAISHI, F.M. **Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel do petróleo em água (FSA) em *Astyanax sp.* Utilizando biomarcadores de contaminação.** Dissertação de Mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr.141p. 2003.

ALDRIDGE, W.N. An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 21, p. 89-104, 1990.

ALLEN, P. Determination of haematological parameters of *Oreochromis aureus* (Steindachner) and the effects of heparine on these. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 106A (2), p. 355-358, 1993.

ALMEIDA-VAL, V.M.; VAL, A.L. Adaptação de peixes aos ambientes de criação. In. VAL, A.L.; HONCZARYK, A. (Ed). **Criando peixes na Amazônia.** Manaus, INPA, 160 p., 1995.

ANDERSSON, T.; PESONEN, M.; JOHANSSON, C. Differential induction of cytochrome P-450 dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione

transferase and UDP-glucuronosyltransferase activities in the liver of the rainbow trout by β -naphthoflavone or Clophen A50, **Biochem. Pharmacol.** v. 34, p. 3309, 1985.

ANDRADE, A. J. M.; ARAÚJO, S.; SANTANA, G. M.; OHI, M.; DALSENER, P. R. Reproductive Effects of Deltamethrin on Male Offspring of Rats Exposed during Pregnancy and Lactation. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 36, p. 310-317, 2002.

APPELBERG, R.; PEDROSA, J.M.; SILVA, M.T. Host and bacterial factores control the *Mycobacterium avium*-induced chronic peritoneal granulocytosis in mice. **Clin. Exp. Immunol.** v. 83, p. 231-236, 1991.

BALINT, T.; SZEGLETES, Z.; SZEGLETES, Zs.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous metidation and the pyrethroid deltamethrin. **Aquat. Toxicol.** v.33, p. 279-295, 1995.

BARILE, F.A.; DIERICKX, P.J.; KRISTEN, U. *In vitro* cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biol Toxicol.** v. 10, p. 155-162, 1994.

BARLOW, S. M; SULLIVAN, F. M.; LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. **Food Chemical Toxicol.** v. 39, p. 407-422, 2001.

BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida e micro extração em fase sólida de piretróides em água. **Quim. Nova.** v.24(2), p. 172-175, 2001.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.** v. 1, p. 3-26, 1991.

BARTON, B.A; ZITZOW, R.E. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. **Prog. Fish-Cultur.** v.57, p. 267-276, 1995.

BENARJI, G.; RAJENDRANATH, T. Haematological changes induced by an organophosphorus insecticide in a freshwater fish *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Trop. Freswat. Biol.** v. 2, p. 197-202, 1990.

BHATNAGAR, S.; SAKSENA, D.N. Observations on certain haematological and biochemical parameters of blood in an air-breathing teleost, *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Anim. Morphol. Physiol.** v. 36(2), p. 163-168, 1989.

BINDER, R.L.; STEGEMAN, J.J. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in embryos of an estuarine fish. **Biochem. Pharmac.** v.29, p. 949-951, 1980.

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.** v. 25, p. 853-873, 2001.

BRADBURY, S.P.; COATES, J.R. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v.108, p. 133-177, 1989.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Resolução do CONAMA nº. 20, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p.72-89. 30 jun., 1986.

BROWM, E.J. Phagocytosis. **Bio Essays.** v. 17, p. 109-117, 1995.

BROWM, E.J. Adhesive interaction in the immune system. **Cell Biol.**, v. 7, p. 289-295, 1997.

BROWN, A.P.; OLIVERO-VERBEL, J.; HOLDAN, W.L.; GANEY, P.E. Neutrophil activation by polychlorinated biphenyls: structure-activity relationship. **Toxicol. Sci.** v. 46 (2), p. 308-316, 1998.

BRUNETTI, L.; PREZIOSI, P.; RAGAZZONI, E.; VACCA, M. Effects of lipopolysaccharide on hypothalamic-pituitary-adrenal axis *in vitro*. **Life Sci.** v. 54 (10), p. 165-171, 1994.

BOZZO, F.R. **Estudo comparativo da cinética do componente celular inflamatório induzido por diferentes estímulos em *Piaractus mesopotamicus***. Dissertação de Mestrado. FCAV-Unesp, Jaboticabal, 2004.

BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Env. Sci. Tec.**, v. 25, p. 201-268, 1995.

BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzylloxyphenones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. **Biochem. Pharmacol.** v.34, p. 3337, 1985.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. In: AQUICULTURA BRASIL'98, Recife, 1998. Anais..., Recife, v.2, p. 609-620. 1998

CARNEIRO, P.C.F.; MARTINS, M.L.; URBINATI, E.C. Effect of sodium chloride on physiological response and the gill parasite, *Piscinoodinium* sp., in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. **J. Aquac. Trop.** v.17 (4): p. 337-348, 2002.

CASIDA, J.E.; GAMMON, D.W.; GLICKMAN, A.H. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 23, p. 413-438, 1983.

CAVICCHIOLLI, G.; ZAVARINI, A. Observations on the morphology and seasonal variations of blood cells in the whitefish bondella, *Coregonus macrophthalmus* Nussi, of lake Maggiore (North Italy). **Monitore Zool. Ital.** v.11, p.173-182, 1977.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 52, p. 83-91. 2002.

CHADZINSKA, M.; SCISLOWSKA-CZARNECKA, A.; PLYTYCZ, B. Inhibitory effects of morphine on some inflammation-related parameters in the goldfish *Carassius auratus* L. **Fish & Shellfish Immunol.** v. 10, p. 531-542. 2000.

CHOWDHURY, M. J.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. C. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. **Aquat. Toxicol.** v.69, p.149-163. 2004.

CLARK, J.M. Effects and mechanisms of action pyrethrin and pyrethroid insecticides. In: Chang, L.W., Dyers, R.S. (Eds.), **Handbook Neurotoxicol.** Marcel Dekker, Inc., New York, p.511-546, 1995.

COHEN, J.J., DUKE, V. Apoptoses and programmed cell death in immunity. **Annu. Rev. Immunol.** v. 10, p. 267-293, 1992.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Ass. J.** v. 50, p. 550-552, 1944.

COSTA, J.R.M.A. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no rio ribeira (SP/PR).** Dissertação de mestrado, 2001.

COSTA, J. **Padronização de Metodologias para o uso de biomarcadores de contaminação ambiental em traira (*Hoplias malabaricus*, Erythrindae): α -ALAd, metalotioneína e vitelogenina.** Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Pr. 104p., 2006.

DAGGETT, D. A.; OBERLEY, T. D.; NELSON, S. A.; WRIGHT, L. S.; KORNGUTH, S. E.; SIEGEL, F. L. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicol.** v. 128, p. 191-206. 1998.

DAS, B.K. **Studies on the effect of some pesticides and commonly used chemicals on Indian Major Carps and their ecosystem.** PhD. Thesis. Bhubaneswar: Orissa University of Agriculture and Technology, 216 p., 1998.

DAS, B.S.; MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** v.134 (1), p. 109-121, 2003.

DAVIES, P.E.; COOK, S.J. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta* caused by cypermethrin spraying on a tamanian stream. **Aquat. Toxic.** v.27, p. 201-224, 1993.

DAYAL, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A.; DWIVEDI, U. N.; DOEHMER, J.; SETH, P. K. Induction of rat brain and liver cytochrome P450 1A1/1A2 and 2B1/2B2 isoenzymes by deltamethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 7, p.169-178, 1999.

DEMOUTE, J.P. Abrief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroid. **Pest. Sci.** v.27, p. 375-385, 1989.

DENTON, J.E.; YOUSEF, M.K. Seasonal changes in hematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 51(1), p. 151-153, 1975.

DHEER, J.M.S.; DHEER, T.R.; MAHAJAN, C.L. Haematological and haematopoietic responses to acid stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **J. Fish Biol.** v. 30, p. 577-588, 1987.

DORES, E.F.G.C.; FREIRE, E.M.D.L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas, estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Quim. Nova**, v.24 (1), p. 27-36, 2001.

DOWNEY, H. The lymphatic tissue of the kidney of *Polyodon spathula*. **Folia Haematol.** v.8, p. 415-466, 1909.

DUCHIRON, C.; REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. Lindane-induced macrophage activating factor (MAF) production by peripheral blood leukocytes (PBLs) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): involvement of intracellular cAMP mobilization. **Aquat. Toxicol.** v. 56(2), p. 82-91, 2002.

DUNIER, M.; SIWICKI, A.K.; DEMAEL, A. Effects of organophosphorus insecticides: effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). III. In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral response. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 22, p.79-87, 1991.

DUTHIE, E.S. The origin, development and functions of the blood cells in certain marine teleosts. I. Morphology. **J. Anat.** v.73, p. 393, 1939.

EGAAS, E.; SANDVICK, M.; FJELD, E.; KALLQUIST, T.; GOKSOYR, R.A.; SVENSEN, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and GST in brown trout (*Salmo trutta*). **Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.** v.122, p. 337-344. 1999.

ELLIS, A.E.; MUNROE, A.L.S.; ROBERTS, R.J. Defence mechanisms in fish. **J. Fish Biol.**, v. 8, p. 67-78, 1976.

ELLIS, A. E. The leucocytes of fish: a review. **J. Fish Biol.** v. 11, p. 453-491, 1977.

ELLMAN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v.7, p 88-95, 1961.

ELSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. **J.Fish Biol.**v.28, p. 511-521, 1986.

FAVARETTO, A.L.V.; PETENUSCI, S.O.; LOPES, R.A.; SAWAYA, P. Effect of exposure to air on haematological parameters in *Hypostomus regani* (Pisces, Loricariidae) teleost with aquatic and aerial respiration. I. Red cells. **Copeia**. p. 918-920, 1981.

FENT, K.; STEGEMAN, J.J. Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. **Aquatic. Toxicol.** v.24, p.219-240, 1993.

FERNANDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-Induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 72, p. 55-63, 2002.

FERNANDEZ, M.N.; SANCHES, J.R.; MATSUKAZI, M.; PANEPUCCI, L. & RANTIN, F. T. Aquatic respiration in facultative air-breathing: effects of temperature and hypoxia, p.341-352. In: VAL, A.L. & ALMEIDA-VAL, V.M.F.(Ed.). **Biology of tropical fishes**. Manaus, INPA.1999,461p.

FISCH-MULLER, S. Loricariidae-Ancistrinae (Armored catfishes). p. 373-400. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 2003.

FORERO, A.R. Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mikiss* (Salmoniformes :Salmonidae). **Rev. Biol. Trop.**, v.43, p.283-288, 1995.

GALGANI, F.; BOCQUENE, G. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. **Bul. Env. Cont. Toxicol.** v.45 p.234-249, 1990.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo, Livraria Varela Ltda.1994,169p.

GASSNER B.; WÜTHRICH A.; SCHOLTYSIK G.; SOLIOZ M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 281, p. 855-60, 1997.

GHORPADE, N.; MEHTA, V.; KHARE, M.; SINKAR, P.; KRISHNAN S.; RAO, C.V. Toxicity study of diethyl phthalate on Freshwater fish *Cirrhina mrigala*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 53, p. 255-258, 2002.

GIESY, J.P.; R. L. GRANEY. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. **Hydrobiologia**, v.188, p. 21-60, 1989.

GILL, T. S.; PANDE, J.; TEWARI, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon and endosulfan in fish tissues. **Pest. Biochem. Physiol.** v. 38, p. 231-244, 1990.

GLICKMAN, A.H.; LECH, J.J. Hydrolysis of permethrin, a pyrethroid insecticide, by rainbow trout and mouse tissues in vitro. a comparative study. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 66, p. 162-171, 1981.

GLICKMAN, A.H.; WEITMAN, S.D.; LECH, J.J. Differential toxicity of trans-permethrin to rainbow trout and mice. I. Role of biotransformation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 66, p. 153-161, 1982.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic. Toxicol.** v.22, p. 287-311, 1992.

GOLOW, A.A.; GODZI, T.A. Acute toxicity of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis niloticus* (LIN). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.52, p. 351-354, 1994.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **J. World Aquac. Soc.** v. 34 (1), p. 76-84. 2003.

GOWLAN, B.T.; MOFFAT, C.F.; STAGG, R.M.; HOULIHAN, D.F.; DAVIES, I.M. Cypermethrin induces glutathione *S*-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. **Mar. Environ. Res.** v. 54 (2), p. 169-177, 2002.

GREENBERG, S.; SILVERSTEIN, S.C. Phagocytosis. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental Immunology**. p. 941-964, Raven Press. New York, 1993.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P. & SOARES, A.M.V.M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with Juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v.32, p.727-738, 1996.

GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M. C.; SOARES, A. M. V. M. Should the use of inhibition of cholinesterase as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? **Biomarkers**. v.3 (2), p.157-163, 1998.

HABIG, W. H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biol. Chem.** v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HANKS, T.H.; WALLACE, J.H. Determination of cell viability. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.98, p. 188-192, 1958.

HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. **Dev. Comp. Immunol.** v. 18 (1), p. 57-66, 1994.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2ed. Boca Raton : CRC, 1995.

HIEDER, A. F.; HIRSCH-ERNST, K. I.; BAUER, D.; KAHL, G. F.; DESEL, H. Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.** v. 62, p. 71-79, 2001

HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish Shellfish Immunol.** v. 2, p. 79-98, 1992.

HOUSTON, A.H.; MURAD, A. Erythrocytodynamics in fish – recovery of the goldfish *Carassius auratus* from acute anemia. **Can. J. Zool.** v.73, p. 411-418, 1995.

HOUSTON, A.H.; ROBERTS, W.C. & KENNINGTON, J.A. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus*. **L. Fish Physiol. Biochem.** , v.15(6), p.481-489, 1996.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A.; ROBERTSON, J.L.; FELDMAN, B.; VEIT, H. P.; LIBEY, G.S.; TINKER, M.K. Comparison of hematologic reference intervals between culture system and type of hybrid striped bass. **Am. J. Vet Res.** v. 57, p.618-623, 1996.

HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Vet. clin. pathol.** v.29, 2000.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. Enquadramento dos cursos d'água do Estado do Paraná. Portarias SUREHMA 1989/1992. 41p.

IWAMA, G.K.; GREER, G.L.; RANDALL, D.J. Chances in selected haematological parameters in juvenile *Chinook salmon* subjected to a bacterial challenge and a toxicant. **J. Fish Biol.** v. 8, p.139-142, 1986.

IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Enviroment.** Academic Press. v. 15. San Diego, Califórnia, 1996.

JAKOWSKA, S. Algunos problemas en hematologia comparada. **Rev. Biol. Trop.**,v.7(2), p. 143-155,1959.

JENKINS, J.A.; KLESIUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of *channel catfish*. **J. Aquat. Anim. Health.** v.10, p. 69-74, 1998.

JOHANSSON-SJOBECK, M.; LARSSON, A. Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinc acid dehydrates activity and haematological variables in the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 8, p. 419–431. 1979.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. Catalytic antibodies with acetylcolinesterase activity. **J. Immunol. Meth.** v.269, p. 13-28, 2003.

JONSSON, C.M.; FERRACINI, V.L.; PARAIBA, L.C.; RANGEL, M.;AGUIAR, S.R. Alterações bioquímicas e acúmulo em Pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Sci. Agric.** v. 59(3), p. 441-446, 2002.

JORDAN, .H.E.; SPEIDEL,C.C.Studies on lymphocytes.II. The origin and fate of lymphocytes in fishes. **J. Morphol.**,v.38, p.529-546,1924.

KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rats erythrocytes: as possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicol.** v. 105, p. 197-205, 1999.

KLEBANOFF, S.J. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism, In: GALLIN, J.J. et al., (Ed.) **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.** v.23, p. 391-444, Raven Press Ltda. New York, 1988.

KLEMZ, C. **Uso de Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Peixes *Ancistrus sp* (Cascudo).** Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Pr. 67p., 2002.

KORI-SIAKPERE, O. Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. **J. Fish Biol.** v. 27, p. 259-263, 1976.

KULKARNI, A.P.; HODGSON, E. The metabolism of insecticides: the role of monooxygenase enzymes. **Annu. Rev. Pharmacol.** v. 24, p. 19–42, 1984.

KUROGI, J.; IIDA, T. Impaired neutrophil defense activities and increased susceptibility to Edwardsiellosis by cortisol implantation in tilapia. **Fish Pathol.** v. 37 (1): p. 17-21, 2002.

LABROT, F.; RIBERA, D.; SAINT DENIS, M.; NARBONNES, J. F. In vitro and in vivo studies of potencial biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidases activities in three non-mammalian species. **Biomarkers.** v. 1, p. 21-28, 1996.

LAMAS, J.; ELLIS, A.E. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. **Fish Shellfish Immunol.** v.4, p. 201-219, 1994.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D.W.; TORANZO, A. E.; ANADÓN, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **J. Fish Biol.**, v.45(5), p. 839-854, 1994.

LANE, H.C. Progressive changes in hematology and tissue water os sexually mature trout, *Salmo gairdneri* Richardson during the autumn and winter. **J. Fish Biol.** v. 15, p. 425-436, 1979.

LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. **Comp Biochem Physiol.** v. 131, Part C, p 231–243. 2002.

LARSSON, A. ; JOHANSSON-SJOBECK, M.J.; FANGE , R. Comparative studies of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. **J. Fish Biol.**, v.9, p. 425-440, 1976.

LEAVER, M.J.; CLARKE, D.J.; GEORGE, S.G. Molecular studies of the phase II xenobiotic-conjugating enzymes of marine *Pleuronectid flarfish*, **Aquat. Toxicol.** v.22, p. 425, 1992.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSERETTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquacul.** v.239, 497-507, 2004.

LIM, C.; KLESIUS, P. H.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictalury* challenge. **Aquacul.** v.185, 313-327. 2000.

LORENZI, T. F. **Manual de propedêutica e clínica.** São Paulo, MDSI. 1999, 641p.

MACARTHUR, J.L.; THOMSON, A.W. & FLETCHER, T.C. Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa*. L. **J.Fish Biol.** v. 27, p. 667-676, 1985.

MANAHAN, S. E. **Environ Chem.** 7.ed. Boca Raton : LEWIS, 2000.

MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados.** Tese de

Doutorado em Aquicultura. Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000, 130p.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Rev. Ictiol.** v.9 (1-2), p. 25-31, 2001.

MARTINS, M.L.; NOMURA, D.T.; MYIAZAKI, D.M.Y.; PILARSKY, F.; RIBEIRO, K.; CASTRO, M.P.; CAMPOS, C.F.M. Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to a single and consecutive stress of capture. **Acta Scient.** 2003

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (osteichthyes: cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **B. Inst. Pesca.** v. 30(1), p. 71 - 80, 2004 .

MASSOULIÉ, J.; ANSELMET, A.; BOM, S.; KREJCI, E.; LEGAY, C.; MOREL, N.; SIMON, S. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translation processing, quaternary associations and localization. **Chemico-Biol. Int.** v.119, p. 29-42, 1999.

MATAQUEIRO, M.I. **Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887).** Dissertação de Mestrado em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal. 41 p. 2002.

MATHEWS, C. K.; HOLDE, K. E. van. **Biochem.** Redwood City : Benjamin/Cummings, 1990.

MATTSSON, K.; LEHTINEN, D-J.; TANA, J.; HARDG, J.; KUKKONEN, J.; NAKARI, T.; ENGSTROM, C. Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.49, p.144-154. 2001.

MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. **Dev. Comp. Immunol.** v.23, p. 451-457, 1999.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.33(1), p. 5-10, 1996.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biological markers of environmental.** Boca Raton: Lewis Publishers. p. 3-16, 1990.

MCCORMICK, S.D.; NAIMAN, R.J. Hypoosmoregulation in an anadromous teleost : influence of sex and maturation. **J. Exp. Zool.**, v.234, p.193-198, 1985.

MCGREGOR, D. B. Pesticide residues in food 2000: Deltamethrin. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France. 2000.

MELA, M. **Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra)**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, UFPR, Curitiba, Pr, p.144, 2004.

MESTRES, R.; MESTRES, G. Deltamethrin: uses and environmental safety. **Rev. Environ. Contamin. Toxicol.** v. 124, p. 1-18, 1992.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, K.J.; GARCIA-MARTINEZ, P.; LEMAIRE, P.; PETERS, L.D.; LIVINGSTONE, D.R. Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in Turbot and other flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds. **Mar. Environ. Res.** v.42, p. 329-333, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** v.43, p.109-142, 1991.

MOORE, A.; WARING, C.P. The effects of a synthetic pyrethroid on some aspects of reproduction in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquat. Toxicol.** v.52, p. 1-12, 2000.

MURRAY, S.A. Hematological study of the bleugill, *Lepomis macrochirus* Raf. **Comp. Biochem. Physiol.** v.78A(4), p. 787-791, 1984.

NATT, M.P.; HERRICKS, C.A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Sci.** v. 31, p. 735-738, 1952.

NATH, R.; BANERJEE, V. Effect of pesticides methylparathion and cypermethrin on the air-breathing fish *Heteropneustes fossilis*. **Environ. Ecol. Stat.** v. 14, p. 163-165, 1996.

NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B.Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.** v. 3, p. 65-70, 1991.

NAYAK, A.K.; DAS, B.K.; KOHLI, M.P.S.; MUKHERJEE, S.C. The immunosuppressive effect of α -permethrin on *Indian Major carp*, rohu. **Fish Shellfish Immunol.** v. 16, p. 41-50, 2004.

NEUMANN, N.F.; FAGAN, D.; BELOSEVIC, M. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. **Dev. Comp. Immunol.** v. 19 (6), p. 473-482, 1995.

NEUMANN, N.F.; BARREDA, D.R.; BELOSEVIC, M. Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures. **Fish Shellfish Immunol.** v. 10, p. 1-20, 2000.

NICARETTA, L. **Biomarcadores para detecção de Efeitos Subletais Causados pela Deltametrina em *Ancistrus multispinis***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Pr. 71p., 2003.

OLIVEIRA-SILVA, J.J.; ALVES, S.R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P.N.; MATTOS, R.C.O.C.; MOREIRA, J.C. Influência de fatores socioeconômico na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Rev. Saude Pub.** v. 35(2), p. 130-135, 2001.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, E.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.** v. 90, p. 217-225. 2002a.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H.; PELLETIER, E. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.51, p.161-167. 2002b.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. **J. Biol. Chem.** v. 239(7), p. 2370-2378, 1964.

OOST, R.V.D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E.. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.13, p. 57-149. 2003.

PADRÓS, F.; CRESPO, S. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthamus maximus*: a light and electron microscope study. **Aquaculture**. v.144, p. 1-16, 1996

PAGNIELLO, K.B.; BOLS, N.C.; LEE, L.E.J. Effect of corticosteroids on viability and proliferation of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line, RTS11. **Fish Shellfish Immunol.** v. 13 (3), p. 199-214, 2002.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. **Chemosphere**. v.62 (8), p.1324-1332, 2006.

PAULSEN, S.M.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunol.** v. 11, p. 23-37, 2001.

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: **Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in eastern Europe**. 1 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 1 (9), p.123-133, 1999.

PEDDIE, S.; ZOU, J.; SECOMBES, C.J. Immunoestimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of ergosan. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.86, p. 101-113, 2002.

PELLIZZON, C.H.; NAKAGHI, L.S.O.; AZEVEDO, A.; CASALETTL, L. & LUNARDI, L. O. Localization of peroxidase activity in blood mononuclear phagocytes in pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.34 (4), p. 377-379, 2002.

PÉREZ, J.E.; BOADA, A.; OJEDA, G. Blood parameters in fishes. Hemoglobin concentration, hematocrit and the number of red blood cells in some freshwater fishes of eastern Venezuela. **Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela**. v.23(1/2), p. 43-47, 1984.

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction, **TIPS**, v. 18, p. 418-425, 1997.

PESTANA, M.N.T.S. **Resposta peritoneal precoce à inoculação intraperitoneal de microbacterias. Estudo experimental no ratinho.** Tese de Doutorado, Universidade do Porto, Portugal. 1994.

PETERS, L.D.; PORTE, C.; ALBAIGES, J.; LIVINGSTONE, D.R. 7-Ethoxyresorufin *o*-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in Larvae of Sardine (*Sardina Pilchardus*) from the North Coast of Spain. **Mar. Pollution Bull.** v.28 (5), p. 299-304, 1994.

PICKERING, A.D. Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.53, p.252-259, 1984.

PHILIP, G. H.; REDDY, P. M.; SRIDEVI, G. Cypermethrin-Induced in vivo alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 31, nº 2, p. 173-178, 1995.

POLAT, H.; ERKOC, F.U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere.** v.49, p. 39-44, 2002.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 60, p. 147–156. 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análise hematológica de curimatá(*Prochilodus scrofa*), pacu(*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui(*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **B.Inst.Pesca**, v.25, p.77-83, 1998/1999. RAMBHASKAR, B.; SRINIVASA-RAO, K. Comparative haematological of ten species of marine fish from Visakhapatnam coast. **J. Fish Biol.** v.30, p. 59-66, 1987.

REDDY, P. M.; PHILLIP, G. H. Changes in the levels of respiration and ions in the tissues of freshwater fish, *Labeo rohita* under fenvalerate stress. **Chemosphere.** v. 25, p. 843-852, 1992.

REDDY, P.M.; PHILIP, G.H. In vivo inhibition of AchE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. **Bull. Env. Cont. Toxicol.** v. 52, p. 619-626, 1994.

REGAN, C. T. Descriptions of new fishes of the family Loricariidae in the British Museum Collection. **Proc. Zool. Soc. Lond.** 666-670, 1912.

REYNAUD, S.; DUCHIRON, C.; DESCHAUX, P. 3-Methylcholanthrene inhibits lymphocyte proliferation and increases intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquat. Toxicol.** v. 63(3), p. 319-331, 2003.

RIFKIND, R.A.; BANK, A.; MARKS, P.A.; NOSSELL, H.L.; ELLISON, R.R.; LINDENBAUM, J. **Fundamentals of Hematology**, 2º ed. Yearbook Medical Publishers, Inc., Chicago, 1980.

ROBERTS, R.J. **Fish pathology**. 2º ed. Bailliere Tindall, London, 1989.

ROCHA, R.M.; FLORES, C.Q. The ultrastructure of the hematopoietic tissue in the head kidney of matrinxã, *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Teleostei – Characidae). **Acta Microscopica**. Supl. B, p. 207-208, 2001.

RODRIGUES, L.C. **Estudo das Glutation S-Transferases Hepáticas Solúveis do Peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu)**. Tese Doutorado, Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes / UERJ, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

RODRIGUEZ-ARIZA, A.; DORADO, G.; PEINADO, J.; PUEYO, C.; LOPEZ-BAREA, J., Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish South-Atlantic littoral, **Biochem. Soc. Trans.** v.19, p. 301, 1991.

RONDON-VON OSTEN, J.; ORTIZ-ARANA, A.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A.M.V.M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere**. v.58, p. 627-636, 2005.

ROSZELL, L.E.; RICE, C.D. Innate cellular immune function of anterior kidney leucocytes in the gulf killifish, *Fundulus grandis*. **Fish Shellfish Immunol.** v. 8, p.129-142, 1998.

RUSSO, M. The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes to bacteria lipopolysaccharides, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.134, p. 326-330, 1980.

RUZO, L. O.; ENGEL, J. L.; CASIDA, J. E. Decamethrin metabolism in rats. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 26, p. 918-925, 1978.

SARMENTO, A.; MARQUES, F.; ELLIS, A.E.; AFONSO, A. Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immunol.** v. 16, p.79-92, 2004.

SARMENTO, A.; GUILHERMINO, L.; AFONSO, A. Mercury-dependent decrease of macrophage activation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **CICTA 2003-Environmental Problems in an Iberoamerican Context**, Porto, Portugal, 2003.

SAMPATH, K.; VELAMMAL, S.; KENNEDY, I.J.; JAMES, R. Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. **Acta Hydrob.** v. 35, p. 73-83, 1993.

SANTOS, R. V. A racionalidade dos agrotóxicos e seus efeitos deletérios à saúde. **Caderno Informativo de Prevenção de Acidentes**, São Paulo, n. 200, p. 59-65, 1996.

SARAVANA BHAVAN, P.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcomsonii* exposed to endosulfan. **Aquatic Toxicol.** v. 50, p. 331-339, 2000.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HANQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotox. Env. Saf.** v.56, p. 295-301, 2003.

SCHÜTT, D.A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R.; HAMERS, R. Haematological of swordtail, *Xiohoohorus helleri*. I. blood parameters and light microscopy of blood cells. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 13, p. 83-89, 1997.

SCOTT, K.; LEAVER, M.; GEORGE, S. Regulation of hepatic glutathione S-transferase expression in flounders, **Mar. Environ. Res.** v. 34, p. 233, 1992.

SECOMBES, C.J. Lymphokine-release from rainbow trout leucocytes stimulated with concanavalin A. Effects upon macrophage spreading and adherence. **Dev. Comp. Immunol.** v.11, p. 513-520, 1987.

SECOMBES, C.J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. **In Techniques in Fish Immunol.** v. I (J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. van Muiswinkel) p. 137-154. Fairhaven, N.J.: SOS Publications, 1990.

SECOMBES, C.J. Enhancement of fish phagocyte activity. **Fish Shellfish Immunol.** v.4, p. 421-436, 1994.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. **In The Fish Immune System: Organism, pathogen, and environmental** (G. Iwama; T. Nakanishi) p. 63-95. San Diego: Academic Press, 1996.

SECOMBES, C.J.; FLETCHER, T.C. The role of phagocytes in protective mechanisms of fish. **Ann. Rev. Fish Dis.** v. 2, p. 53-71, 1992.

SENER URAL, M.; SAGLAM, N. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fly rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). **Pest. Biochem. Physiol.** v.83, p. 124-131, 2005.

SETTLEMIRE, C. T.; HUSTON, A. S.; JACOBS, L. S.; HAVEY, J. C.; HOWLAND, J. L. Action of some insecticides on membranes of mouse liver mitochondria. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 11, p. 169-173, 1974.

SEVGILER, Y.; ORUÇ, E.O.; UNER, N. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pestic. Biochem. Physiol.** v. 78, p. 1-8, 2004.

SHABANA, M.B.; KHADRE, S.E.M.; LOTFY, M.M. Haematological studies on the healthy catfish *Clarias lazera*. **Bull. Natl. Inst. Oceanogr. Fish Egypt.** v.16(1), p. 135-145, 1990.

SHONO, T.; OHSAWA, K.; CASIDA, J.E. Metabolism of trans- and cis-permethrin, trans- and cis-cypermethrin, and decamethrin by microsomal enzymes. **J. Agric. Food Chem.** v. 27, p. 316-325, 1979.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** 99 p. Tese de doutorado. Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.

SILVA, M.T.; APELBERG, R.; SILVA, M.N.T. & MACEDO, P.M. *In vivo* killing and degradation of *Mycobacterium aurum* within mouse peritoneal macrophages. **Infect. Immun.** v. 55, p. 2006-2016, 1987.

SIWICKI, A.K.; COSSARINI-DUNIER, M.; STUDNICKA, M.; DEMAEL, A. *In vivo* effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. **Ecotoxiol. Environ. Saf.** v. 19, p. 99-105, 1990.

SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicol.** 2001

SOLEM, S.T.; JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immunol.** v. 5, p. 475-491, 1995.

SOPINSKA, A. Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns. III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. **Acta Ichthyol. Pisc.** v.15, p.141-165, 1984.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature.** v.2, p. 295-302, 2001.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions.** v. 1, p. 97-103, 1985.

SPECKNER, W.; SCHINDLER, J.F.; ALBERS, C. Age-dependent changes in volume and hemoglobin content of erythrocytes in the carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Exp. Biol.** v. 141, p.133-149, 1989.

STEGEMAN, J.J.; BINDER, R.L.; ORREN, A. Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed-function oxygenases in the marine fish *Stenotomus versicolor*, **Biochem. Pharmacol.** v. 28, p. 3431-3439, 1979.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. **Aquat. Toxicol.: Mol. Biochem. Cell Persp.** OSTRANDER, G.K.; MALINS, D. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.J.; FORLIN, L.; FOWLER, B.M.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P. Molecular responder to environmental contaminations: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological markers of Anthropogenic Stress**, HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L.; Eds. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 235, 1992.

STUEHR, D.J.; MARLETTA M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 82, p.7738-7742, 1985.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **J. Fish Biol.** 29: 349-364, 1986.

SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. **Ann. Rev. Fish Dis.** v. 2, p.149-160, 1992.

SVOBODA, M.; LUSKOVA, J.; DRASTICHOVA, V.; ZLABEK, V. The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Vet. Brno.** v. 70, p. 457-465, 2001.

SZEGLETES, T.; BALINT, T.; SZEGLETES, Z.; NEMCSOK, J. In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AchE, **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 31, p. 258-263, 1995.

TADA, H.; SHIMO, O.; KUROSHIMA, K.I.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin-2. **J. Immunol. Meth.**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TAFALLA, C.; NOVOA, B. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. **Dev. Comp. Immunol.** v. 24 (6-7), p. 623-631, 2000.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** 2 ed. New York, Fisher, 1995.

TANDON, R.S.; JOSHI, B.D. Total red and white blood cell count of 33 species of fresh water teleosts. **Z. Tierphysiol. Tierernahrg. Futtermittelkde.** v.37, p. 293-297, 1976.

TAVARES-DIAS, M. **Estudos parasitológicos e hematológicos oriundos de “pesques-pagues” do município de Franca, São Paulo. Dissertação de Mestrado em Aqüicultura.** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal. 130p. 2002.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIN, E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Sci.** v. 20, p.151-263, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI,R.A.; GIOLI, L.D. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros.II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes:Characidae) em policultivo intensivo. **Rev. Bras. Zool.** v. 16, p. 423-431, 1999a.

TAVARES-DIAS, M.; FRASCA-SCORVO, C.M.D.;MORAES, F.R. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros.Iv. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes:Characidae). **Ars Vet.** v. 15, p. 149-153, 1999b.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; NASCIMENTO, K.S. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes,

Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Rev. Bras. Zool.** v. 16, p. 553-555, 1999c.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L. et al. Haematological characteristics of Brazilian teleosts III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*)(Osteichthyes:Characidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 17, p. 899-926, 2000a.

TAVARES-DIAS, M.; FRASCA-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C. et al. Haematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In. PROCEEDINGS INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro: Fitzmmons, K., Carvalho Filhos, J. p. 533-541, 2000b.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G. & MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.32(4), p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ed. Eletrônica e Arte Final. Riberão Preto. SP.144p., 2004.

THOMAS, M.B.; THOMAS, W.; HORNSTEIN, T.M.; HEDMAN, S.C. Seasonal leukocyte and erythrocyte counts in fathead minnows. **J. Fish Biol.**,v.54, p.1116-1118, 1999.

THUVANDER, A.; NORRGREN, L.; FOSSUM, C. Phagocytic cells in the blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. **J. Fish Biol.** v.31(2), p.197-208, 1978.

THUVANDER, A.; WISS, E.; NORRGREN, L. Sublethal exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Clophen A50: effects on cellular immunity. **Fish Shellfish Immunol.** v. 3, p. 107-177, 2002.

TIMUR, G.; ROBERTS, R.J.; McQUEEN, A. Carrageenin granuloma in the place (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. **J. Comp. Pathol.** v. 87, p. 83-87, 1977.

TORTELLI, V. **Atividade colinesterásica no monitoramento ambiental: Importância da determinação de parâmetros cinéticos em peixes estuarinos**. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, 2005.

TSUDA, T.; AOKI, S.; INOUE, T.; KOJIMA, M. Accumulation and excretion of diazinon, fenthion and fenitrothion by killfish: comparison of individual and mixed pesticides. **Water Research.** v.29 (2), p. 455-458, 1995.

ULICH, T.R.; WATSON, L.R.; YIN, S.; GUO, K.; WANG, P.; THANG, H.; CASTILLO, J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines: Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS, IL-1, and TNF-induced inflammatory infiltrate. **Am. J. Pathol.** v. 138, p.1485-1496, 1991.

VAL, A. L. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of Amazon, p.59-73. In: VAL, A.; ALMEIDA-VAL, V.M.; RANDALL, D.J. (Ed.) **Physiol. Biochem. Fishes Amazon**. 420 p., 1996.

VAL, A. L. Water-air-breathing transition in fishes of Amazon, p. 145-161. In: MITTAL, A.K.; EDDY, F.B.; DATTA MUNSHI, J.S. (Ed.) **Water/air transition in Biology**. New Delhi Oxford & IBH Publishing Co. PVT.LTD., 1999.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.; AFFONSO, E.G. Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobin, hematology, intraerythrocytic of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). **Comp. Biochem. Physiol.** v.97B(3), p. 435-440, 1990.

VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish Shellfish Immunol.** v. 13, p. 183-198, 2002.

VAN FURTH, R. Monocyte production during inflammation. **Comp. Immunol Microbiol Infect Dis.** v. 8, p. 205-211, 1985.

YOUNG, P.S.; CECH, J.J.Jr. Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v.50 (10): p. 2094-2099, 1993.

WALTER, G.L.; JONES, P.D.; GIESY, J.P. Pathologic alterations in adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to dietary 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Aquat. Toxicol.** v. 50, p. 287-299, 2000.

WANG, R.; NEUMANN, N.F.; SHEN, Q.; BELOSEVIC, M. Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. **Fish Shellfish Immunol.** v. 5, p. 329-346, 1995.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; MCLEAY, D. J. **Stress and acclimation**. In Methods for Fish Biology (Schreck; CB and Moyle, PB, eds), pp. 451-489. Bethesda, MD: American Fisheries Society. 1990.

WEISS, C.M. Stream Pollution – Response of fish to sublethal exposures of organic phosphorus insecticides. **31st Ann Meeting Federation of Sewage and Industrial Wastes**. Detroit. v.31(5), 1958.

WEYTS, F.A.A.; COHEN, N.; FLINK, G.; VERBURG –Van KEMENADE, B.M.L. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. **Fish Shellfish Immunol.** v.9, p.1-20, 1999.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecol. Econ.** v.39 (3), p. 449-462, 2001.

WHITE, A.; FLETCHER, T.C.; PEPYS, M.B.; BALDO, B.A. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 69 C, p. 325-329, 2004

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 97 – Deltamethrin. **Geneva:International Programme on Chemical Safety – IPCS**, 1990.

WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem Physiol.** v.100, p.173-176, 1991.

WRIGHT, J.; GEORGE, S.; MARTINEZ-LARA, E.; CARPENE, E.; KINDT, M. Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. **Mar. Environ. Res.** v.50, p.503-508. 2000.

ZELIKOFF, J.T; BOWSER, D.;SQUIBBS, K.S.; FRENKEL, K. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. **J. Toxicol. Environ. Health.** v. 45, p. 235-48, 1995.

ZHANG, Y.S.; ANDERSSON, T.; FORLIN, L. Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by β -naphthoflavone. Time course studies. **Comp. Biochem Physiol.** v. 95B, p. 247, 1990.

8) APÊNDICE

8.1) DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES

- Lipopolissacarídeo *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma ,Chemical & Co.,EUA) 100 ng /mL (diluído em salina estéril);
- Solução salina estéril 0,9% (BDH).
- Deltametrina ($C_{22}H_{19}Br_2NO_3$) de grau técnico 99,8% Aventis CropScience Brasil (São Paulo/SP), dissolvida em 4 gotas Tween 80 estéril (Merck) e solução salina estéril 0,9%; (100 ng/mL).
- EDTA (BDH).
- Soro fetal bovino (Cultilab ,São Paulo/SP, Brasil).
- Meio de cultivo L-15 (Cultilab ,São Paulo/SP, Brasil).
- Percoll e diluentes (Cultilab ,São Paulo/SP, Brasil).
- Penicilina /Streptomicina (Cultilab, São Paulo/SP, Brasil).
- Heparina (Liquemine, Roche, Brasil).
- Dexametasona (4 mg.mL^{-1}) (Decadronal, Prome, Brasil).
- Eosina amarela (Merck, Brasil).
- Tripsina 25% (Sigma Chemical & Co., EUA).
- Cloreto de naftiletilenodiamina 0,1% (Sigma Chemical & Co., EUA).
- Sulfanilamina a 1% (Sigma Chemical & Co., EUA).
- Solução de Tripsina (Sigma Chemical & Co., EUA).
- DTNB (Sigma Chemical & Co., EUA).
- Iodeto de acetilcolina (Sigma Chemical & Co., EUA).
- CDNB (Sigma Chemical & Co., EUA).
- GSH (Sigma Chemical & Co., EUA).
- Resorufina (Sigma Chemical & Co., EUA).
- NADPH (Sigma Chemical & Co., EUA).
- Metanol (Merck, Brasil)
- Solução de Bradford (Merck. Brasil).
- Álcool absoluto (Merck, Brasil).

- Formoldeído (Merck, Brasil).
- Ácido acético (Merck, Brasil).
- Paraplast plus (Sigma, Brasil).
- Albumina (Mayer).
- Xilol (Merck, Brasil).
- Hematoxilina / Eosina (cedida pelo Laboratório de Histopatologia – PUCPR)
- Tris (hidroximetil)-aminometano (Serva)

8.2) SOLUÇÕES, TAMPÕES E MEIO DE CULTURA

- Solução mãe de PBS (salina tamponada em fosfato)

NaCl.....	80g
KCl.....	2g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O.....	14,4g
KH ₂ PO ₄	2g
Água bidestilada (mili-Q).....	q.s.p. 1000 mL

Depois autoclavar para armazenar. Acertar o pH para 7,2-7,4.

- Solução mãe de PSB (peixe)

NaCl.....	6,054g/L
KH ₂ PO ₄	0,218 g/L
Na ₂ PO ₄	0,11g/L
KCl.....	0,94g/L
CaCl ₂ .H ₂ O.....	0,132 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,0996 g/L
Água bidestilada (mili-Q).....	q.s.p. 1000 mL

Depois autoclavar para armazenar. Acertar o pH para 7,4.

- PBS para coletar o exsudato peritoneal

PBS (diluído 1:10 em água mili-Q).....	30mL
Heparina (0,2 mL de heparina /100mL de PBS diluído).....	0,6mL
Albumina 3% (1 mL de albumina /100 mL de PBS diluído).....	3mL

- Albumina bovina 3%

Albumina.....	3g
PBS diluído.....	100 mL

- Corante pancrônico de Rosenfeld

Corante de Giensa (azul eosina – azul metileno)..... 0,97g
 Corante de May-Gronwald(eosina –azul metileno)..... 0,53g
 Acrescentar em um litro de metanol P.A. e filtrar.

- Solução de Eosina

Eosina amarelada1g
 Solução Fisiológica.....q.s.p. 100 mL

- Corante de Natt / Herrick's (contagem de leucócitos e eritrócitos):

NaCl3,88g
 Na₂SO₄2,50g
 Na₂HPO₄.12H₂O2,91g
 KH₂PO₄0,25g
 37% formalina7,5 mL
 Metil violeta 2B.....0,10g
 Água destiladaq.s.p.1000 mL

- Solução de Tripsina 0,25%

Tripsina..... 0,25 g
 Solução Salina.....q.s.p 100 mL

- Viabilidade celular por MMT

MTT(Sigma)250mg
 Solução salina tamponada sem Ca e Mg..... 50mL

- Solução de SDS 10% acídica:

Ácido clorídrico 1M(BDH)..... 5mL
 SDS (Sigma)..... 50g
 Água destiladaq.s.p.500 mL

- Solução Alfac

Álcool a 80%85 mL
 Formaldeído.....10 mL
 Ácido acético Glacial5 mL

- Solução tampão Tris 0,1M

Tris (hidroximetil)-aminometano (Serva)121,14 g
Água destiladaq.s.p. 1000m L

- Solução tampão NaCl 0,1M

Solução NaCl (Merck) 58,44 g
Água destiladaq.s.p. 1000m L